

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 316**

51 Int. Cl.:

A61K 36/58 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2005 E 05764528 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **22.08.2007 EP 1819352**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de Carapa Guianensis.**

30 Prioridad:

21.07.2004 BR 0402875

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2013

73 Titular/es:

**FIOCRUZ, FUNDAÇÃO, OSWALDO, CRUZ
(100.0%)**

AVENIDA BRASIL 4365

MANGUINHOS 21045-900, RIO DE JANEIRO, BR

72 Inventor/es:

**HENRIQUES, MARIA DAS GRAÇAS MULLER DE
OLIVEIRA;**

MONTEIRO, CARMEM PENIDO;

SIANI, ANTONIO CARLOS;

GUILHERMINO, JISLAINE DE FÁTIMA;

RAMOS, MÔNICA FREIMAN DE SOUZA;

SAMPAIO, ANDRÉ LUIZ FRANCO;

ROSAS, ELAINE CRUZ;

DE LIMA, LUCILENE AZEVEDO y

PENNAFORTE, RENATO JABOUR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 316 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de *Carapa guianensis*.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas a base del aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y/o a base de compuestos químicos aislados de este aceite, que son responsables de su actividad biológica, los tetranortriterpenoides. Las composiciones farmacéuticas de esta invención presentan las siguientes actividades farmacológicas: antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora, y los compuestos citados reducen sustancialmente la aparición de efectos secundarios y tienen bajo coste de fabricación.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se dirigen al tratamiento, o la prevención, o la inhibición de estados alérgicos e inflamatorios de los seres humanos, mediante uso oral o tópico. En cada uno de estos casos, el compuesto puede presentarse en forma líquida o sólida, y el compuesto de uso tópico puede encontrarse, asimismo, en forma semisólida. Los compuestos de esta invención para uso tópico, no son tóxicos o tienen baja toxicidad y son proporcionados, especialmente, en forma semisólida (crema).

15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención constituyen una alternativa terapéutica importante para el tratamiento de alergias cutáneas y respiratorias, además de actuar en diferentes reacciones inflamatorias de origen alérgico o de origen infeccioso.

Por tanto, estos compuestos se utilizan también para el tratamiento sintomático de procesos reumáticos, inflamatorios y degenerativos, traumas diversos, dolor e inflamación posoperatoria y síndromes dolorosos agudos, entre otros, y pueden ser administrados por vía oral o en forma tópica..

20 Antecedentes de la invención

Aproximadamente el 25-30% de la población mundial presenta algún tipo de alergia, es decir, 1.800 millones de personas en todo el planeta son usuarios potenciales de medicamentos antialérgicos. Las alergias más comunes son respiratorias, alimentarias y cutáneas.

25 Durante el proceso alérgico existe liberación de aminas vasoactivas, con histamina como faceta principal debido a que es una de las dianas terapéuticas de los medicamentos antialérgicos. Estos medicamentos son en su mayoría antihistamínicos, es decir, antagonistas de los receptores H1 de la histamina, que son capaces de inhibir sus efectos y evitar los síntomas de la respuesta alérgica. El desarrollo de los primeros medicamentos antialérgicos tuvo lugar en los años 60 y hoy en día esta contribución del mercado farmacéutico es responsable de la venta de aproximadamente 1.657 millones de unidades farmacéuticas de medicamentos antialérgicos.

30 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) representan el cuarto mercado más grande de la industria farmacéutica de Brasil. Los antiinflamatorios que existen en el mercado presentan diversos efectos secundarios, entre los que los más graves son la ulceración gástrica, las hemorragias y las reacciones de hipersensibilidad. Además de esto, todos ellos han sido desarrollados y registrados por la Industria Farmacéutica Internacional, lo que representa un alto coste para la población de países en desarrollo, tales como Brasil. Por tanto, la búsqueda de nuevos medicamentos antiinflamatorios con efectos secundarios reducidos, además de menor coste, tiene suma importancia.

35 Por otra parte, dado que muchas especies vegetales están reconocidas como orígenes de compuestos de actividad terapéutica, estas especies pueden presentar una alternativa a este caso.

40 En los Estados Unidos, entre 1983 y 1994, fueron aprobados 520 nuevos medicamentos, de los que el 39% eran productos naturales o productos derivados de sustancias extraídas de plantas. En la actualidad, el mercado mundial invierte 60.000 millones de dólares por año en la fabricación de medicamentos fitoterapéuticos.

45 La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha comenzado también a desarrollar programas para estimular el uso de plantas medicinales validadas científicamente. Datos relevantes apoyan la importancia de este incentivo para la medicina tradicional, dado que, aproximadamente, una tercera parte de la población de países en desarrollo no tiene acceso a medicamentos esenciales, lo que hace que países tales como China, Corea del Norte, Corea del Sur y Vietnam las incorporen a la medicina tradicional como auxiliar de su sistema sanitario.

50 Recientemente, (solicitud de patente brasileña PI0108940, presentada el 23 de Febrero de 2001) la composición antialérgica a base de plantas, del producto Aller-7™, ha llegado a ser conocida (www.InterHealthUSA.com). protegida por la patente de EE.UU. No. 6.730.332.. Es un compuesto antialérgico sinérgico, a base de plantas, con extractos de : fruto de *Terminalia chebula* (15 a 50% p/p); fruto de *Terminalia bellerica* (15 a 50% p/p); piel de *Albizia lebbek* (0,5 a 50% p/p); fruto de *Emblica officinalis* (15 a 50% p/p) y puede contener también extractos de: fruto de *Piper longum* (0,1a 5% p/p); fruto de *Piper nigrum* (0,1a 5% p/p); raíces de *Zingiber officinale* (0,1a 5% p/p).

Según el documento de la patente y de la información sobre el producto Aller-7™ (www.arrowroot.com/aller-7.asp) tales plantas son conocidas en la medicina de Ayurvedic, para tratar alergias.

La composición sinérgica de la solicitud de patente brasileña PI0108940 se dirige, especialmente, al tratamiento de las rinitis y el asma. Esta composición actúa por estabilización de los mastocitos, es decir, por prevención de la liberación de histamina, responsable de la manifestación de las alergias, con las características siguientes:

- 5 - Intensa actividad antialérgica, que no solo proporciona alivio, en especial de las rinitis alérgicas, el asma alérgico y las bronquitis alérgicas, sino que también ayuda a corregir enfermedades inmunológicas subyacentes;
- el control de manifestaciones alérgicas tales como, estornudos, nariz taponada, ojos acuosos, picor de garganta, ojos y nariz, respiración ruidos y dificultad respiratoria;
- no ocasiona somnolencia ni separación inmunitaria, al contrario que otros medicamentos antialérgicos. También actúa como antiinflamatorio.

10 Sin embargo, las plantas que componen este compuesto antialérgico sinérgico, además de conocidas para el tratamiento de las alergias, tienen sus descripciones botánicas en la publicación Wealth of Asia, y, por consiguiente, son plantas de esta región. Este hecho puede constituir un factor restrictivo cuando se pretende una producción local. Por otra parte, la composición sinérgica de esta patente tiene actividad antiespasmódica, pero no presenta actividad analgésica.

15 Considerando que Brasil contiene el 35% de la diversidad de especies vegetales de la Tierra, puede aportar, por tanto, una contribución decisiva al desarrollo de una terapéutica moderna para el tratamiento de procesos antialérgicos y antiinflamatorios. Además de esto, el desarrollo de medicamentos fitoterapéuticos o de fitofármacos, desempeña un papel esencial en la valoración de materias primas nacionales con un impacto social y medioambiental.

20 Por consiguiente, con el propósito de superar los inconvenientes anteriormente citados, con respecto a los medicamentos antialérgicos y antiinflamatorios actuales, la presente invención propone una nueva e importante alternativa terapéutica basada en plantas nativas, que es tanto o incluso más ventajosa que las del estado actual de la técnica. Es una alternativa terapéutica tal como la de los productos fitoterapéuticos, de *Carapa guianensis* Aublet para uso oral o uso tópico.

25 La *Carapa guianensis* es una especie amazónica de la familia de las Meliaceas, conocida comúnmente como Andiroba, típica de bosques hidrófilos, y puede estar en estado salvaje y también ser cultivada. En Brasil esta especie se encuentra, por ejemplo, en el estado de Tocantins, a todo lo largo del río Solimões hasta la costa del Atlántico, siendo ampliamente usada por sus habitantes así como por los habitantes de otros países sudamericanos que viven en las proximidades del bosque amazónico.

30 Esta especie vegetal se usa comúnmente como repelente, insecticida, antipirético, vermífugo, contra las dermatitis, lesiones y acné, debido a sus propiedades curativas y bactericidas. Sus pieles y hojas se usan para tratar reacciones inflamatorias tales como reumatismo, artritis y dolor, y también contra infecciones del tracto superior respiratorio tales como neumonía, así como también tos y resfriados. La piel se usa para preparar un té contra la fiebre, que también sirve como vermífugo, Transformada en polvo trata heridas y tiene un efecto curativo en

35 afecciones de la piel, dermatitis, lesiones dérmicas secundarias, úlceras, excoiaciones y acné, así como también propiedades antipiréticas. Las siguientes propiedades son atribuidas a las hojas: antiarréica, vermífuga, tónica, antipirética, y sustitutiva de la quinina en el tratamiento de la fiebre palúdica, además de ser extremadamente útil contra eczemas, exantemas y otras afecciones de la piel (Pio Correa).

40 Es sabido que la *Carapa guianensis* o sus extractos, asociada o no a una o más especies vegetales en composiciones farmacéuticas para uso externo, puede aplicarse a :

1) Membranas, tales como piel, cavidad oral, pelo, etc., para evitar o mejorar eficazmente la ausencia de vigor de la función de estas partes del cuerpo, causada por la tensión medioambiental o el envejecimiento (Solicitud de patente JP2001-151634).

45 2) Quitar el pelo del cuero cabelludo con objeto de activar los melanocitos de las raíces del cabello y estimular la producción de melanina . (Solicitud de patente JP2002-020243).

La semilla de Andiroba proporciona un aceite de color amarillento utilizado comúnmente como repelente e insecticida. Durante muchos años los indios han usado este aceite y el vehículo para la aplicación de pintura bixácea y como repelente de insectos hematófagos., poniendo de manifiesto baja toxicidad en aplicaciones tópicas. .En la medicina doméstica el aceite de *Carapa guianensis* se utiliza profusamente para ser frotado sobre tejidos doloridos,

50 tumores y lesiones musculares. Este aceite está caracterizado por las siguientes propiedades terapéuticas: es curativo, diurético, vermífugo, sumamente útil contra eczemas, es purgante, antirreumático, útil contra úlceras crónicas, contra picaduras de insectos, contra el tétanos, las hepatitis y contra enfermedades de la piel, desinfecta heridas y actúa contra las hinchazones de las erisipelas (Pio Correa – Dicionário das plantas úteis do Brasil).

55 El uso de un medicamento etnofarmacológico de esta clase, incluye también el tratamiento de la malaria, la lepra y la neumonía.

El aceite de Andiroba se utiliza también en composiciones cosméticas (champús, cremas de acondicionamiento e hidratantes, según las respectivas solicitudes de patentes BR PI9301949, BR PI9302004 y BR PI9302006).

5 El extracto de lípido obtenido del núcleo de las semillas de Andiroba se ha empleado tradicionalmente por sus propiedades antiinflamatorias contra los dolores reumáticos y los dolores musculares, como ilustra la patente de EE.UU. No. 5.958.421, que se refiere al compuesto farmacéutico o compuesto cosmético para usar sobre la piel y que usa el referido extracto para regular el mecanismo implicado en las celulitis.

Por tanto, los investigadores presentes han observado que hasta el momento actual, la Andiroba ha sido empleada para uso externo, aprovechando principalmente su acción antiinflamatoria.

10 Por otra parte, la patente de EE.UU. No. 4.603.137 describe una sustancia aislada de plantas existentes en la India y de la misma familia de la Andiroba. (Meliáceas). con propiedades antiinflamatorias, analgésicas e inmunomoduladoras (col. 2, líneas 49 a 53), y, en especial, inmunosupresoras. Tal sustancia alcaloidea, cromona, ha sido aislada particularmente desde varias partes de la planta *Dysoxylum binectariferum* (por ejemplo, : hojas, ramas, piel y madera procedente del tronco, y de piel y de madera procedente de las raíces) y puede utilizarse especialmente :

15 - Para el tratamiento de pacientes que presentan respuestas indeseables al sistema inmunitario, presentes en el caso de enfermedades autoinmunitarias que, por regla general, están ocasionadas por anticuerpos y por estados alérgicos o hiperalérgicos del organismo y, en el caso de respuestas inflamatorias crónicas, aportadas principalmente por macrófagos y granulocitos.

20 - Como agente inmunosupresor en trasplantes de órganos o prevención de rechazos, en cuya prevención los linfocitos y los macrófagos desempeñan un papel importante.

Por consiguiente, los compuestos medicamentosos respectivos son también diferentes.

25 Aun cuando la planta tiene el mismo origen de la familia de Andiroba (Meliáceas), el principio farmacológico activo de esta patente (el alcaloide cromona) es diferente de los de esta invención (aceite de Andiroba y/o sustancias químicas aisladas desde este aceite, y responsables de su actividad biológica, los tetranortriterpenoides), debido a que tales principios son obtenidos como de especies diferentes. Por consiguiente, los respectivos compuestos medicamentosos también son diferentes.

30 Los compuestos de esta invención presentan actividades farmacológicas: antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora, con efectos secundarios reducidos. Además de constituir una alternativa terapéutica importante para el tratamiento de alergias de la piel y respiratorias, actúan también en diversas reacciones inflamatorias de origen alérgico así como en reacciones inflamatorias de origen infeccioso. Por tanto, los compuestos de esta invención se utilizan también para el tratamiento sintomático de procesos reumáticos inflamatorios y degenerativos, traumas diversos, dolor e inflamaciones posoperatorias, síndromes de dolores agudos, entre otros, con la posibilidad de poder ser administrados por vía oral o en forma tópica.

Sumario de la invención

35 Esta invención está dirigida a proporcionar una composición farmacéutica caracterizada por comprender como ingredientes activos, los componentes (a) o (b) que siguen:

(a) 5 a 30% de un aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y 0,01% a 5% de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* Aublet, en la que los tetranortriterpenoides son responsables de la actividad farmacéutica;

40 (b) 0,01% a 5% de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* Aublet, en la que los tetranortriterpenoides son responsables de la actividad farmacéutica,

en la que la composición (a) o (b) comprende, además, como vehículo y/o aditivos 0,5 a 6% de base de emulsión; 0,2 a 2% de vaselina sólida; 0,05 a 0,1% de agentes conservantes, 2 a 20% de agentes humidificantes; 0,1 a 10% de 1,8-Cineol; y agua destilada, q.s.p. 100%;

45 en la que la forma farmacéutica de la composición farmacéutica (a) o (b) es oral o tópica, con actividades antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora, con disminución sustancial de efectos colaterales y que tiene un coste de fabricación bajo, debido a que proceden de una materia prima nacional.

50 Esta invención proporciona esta composición farmacéutica para uso oral y para uso tópico y en cada uno de estos casos, la composición puede estar o bien en forma líquida o en forma sólida, y la composición para uso tópico puede estar también en forma semisólida.

La composición farmacéutica de esta invención para uso tópico es atóxica o tiene toxicidad baja, estando constituida por un aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y/o de los tetranortriterpenoides, compuestos

químicos aislados de este aceite y responsables de su actividad biológica, con actividad antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunorreguladora, y es proporcionada, especialmente, en forma semisólida (crema).

5 Otra concreción de la invención es el uso de la composición a base del aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y/o los tetranortriterpenoides, los compuestos químicos aislados desde este aceite y que son responsables de su actividad biológica, como un medicamento antialérgico, antiinflamatorio, analgésico e inmunomodulador.

10 Otra concreción de esta invención es el método de tratamiento, prevención o inhibición de las condiciones alérgicas y procesos inflamatorios, que comprende la administración de una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, de la composición a que se ha hecho referencia, a un ser humano que necesita el referido tratamiento, prevención o inhibición.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención representan, por tanto, una alternativa terapéutica importante para el tratamiento de alergias de la piel y respiratorias.

15 Y otra importante característica de esta invención es el hecho de que actúan no solamente en diferentes reacciones inflamatorias de origen alérgico, sino que también actúan en reacciones inflamatorias de origen infeccioso. Por consiguiente, estas composiciones se emplean también para el tratamiento sintomático de procesos reumáticos, inflamatorios y degenerativos, traumas diversos, dolor e inflamación posoperatoria, síndromes de dolores agudos, entre otros, y pueden ser administradas por vía oral o en forma tópica.

Descripción de los dibujos

20 Figura 1 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema alérgico de la pata en ratones.

Figura 2 - Esta figura muestra el resultado de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema de la pata inducido por histamina en ratones.

Figura 3 – La figura en cuestión hace referencia al resultado de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema de la oreja inducido por histamina en ratones.

25 Figura 4 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis* sobre la exudación pleural inducida por histamina en ratones.

Figura 5 – La figura en cuestión se refiere a los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis*, sobre la exudación pleural después de estimulación con histamina en ratas.

30 Figura 6 – Esta figura se refiere a los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema alérgico de la pata en ratones.

Figura 7 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis*, sobre la movilización celular en la pleuresía alérgica en ratones.

35 Figura 8 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* sobre el edema de la pata, inducido por histamina (A) en ratones y (B) en ratas.

Figura 9 – La figura en cuestión muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema de la oreja del ratón inducido por histamina.

40 Figura 10 – Esta figura hace referencia a los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis*, sobre la exudación pleural inducida por histamina en ratones.

Figura 11 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento tópico previo con formulaciones de cremas a base de aceite de *Carapa guianensis* y con tetranortriterpenoides aislados desde el mismo aceite, sobre el edema alérgico de la pata en ratones (A) y en ratas (B).

45 Figura 12 – Esta figura se refiere a los resultados de tratamiento tópico previo con formulaciones de crema con aceite de *Carapa guianensis* y con tetranortriterpenoides aislados desde el mismo aceite, sobre el edema de la pata inducido por histamina en ratones (A) y en ratas (B).

Figura 13 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de *Carapa guianensis*, sobre el edema de la pata inducido por carragenina en ratones.

Figura 14 – La figura en cuestión muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de Carapa guianensis sobre el edema de la pata inducido por zimosán en ratones..

Figura 15 – Esta figura se refiere a los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de Carapa guianensis, sobre la exudación pleural y pleuresias movilizadas celulares inducidas por carragenina en ratones.

- 5 Figura 16 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, sobre el edema de la pata inducido por el factor de activación de las plaquetas de la sangre (PAF) en ratones.

10 Figura 17 – La figura en cuestión muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, sobre el edema de la pata inducido por bradiquinina en ratas..

Figura 18 – La figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de Carapa guianensis, sobre la hiperalgesia inducida por albúmina de huevo en ratas previamente sensibilizadas.

Figura 19 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de Carapa guianensis, sobre la hiperalgesia inducida por histamina en ratas.

- 15 Figura 20 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con aceite de Carapa guianensis, sobre la hiperalgesia inducida por carragenina en ratas.

Figura 21 – Esta figura muestra los resultados de tratamiento previo (1 hora, vía oral) con tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, sobre la hiperalgesia inducida por histamina en ratas.

20 Figura 22 – La figura muestra el efecto inhibitorio de tratamiento con tetranortriterpenoides aislados desde Carapa guianensis sobre la producción de óxido nítrico por macrófagos murinos.

Figura 23 – La figura muestra la inhibición de la producción de interferón- γ por esplenocitos murinos, por tratamiento con tetranortriterpenoides aislados desde Carapa guianensis.

Figura 24 – La figura muestra el efecto de tratamiento con tetranortriterpenoides aislados desde Carapa guianensis, sobre la producción de TNF- α por macrófagos murinos.

- 25 Figura 25 – La figura en cuestión muestra los resultados de tratamiento con tetranortriterpenoides aislados desde Carapa guianensis, sobre la proliferación de linfocitos murinos.

Figura 26 – La figura muestra el resultado de tratamiento inhibitorio con tetranortriterpenoides aislados desde Carapa guianensis, sobre la fagocitosis de zimosán por macrófagos murinos.

30 Figura 27 – La figura a que hace referencia muestra el efecto de la administración oral de tetranortriterpenoides en la mucosa gástrica de ratones C57/B110. Los resultados están expresados como la Media del Índice de Lesiones (M.I.L.).

Descripción detallada de la invención

35 Datos etnofarmacológicos señalan el uso de aceite de Carapa guianensis para diferentes fines terapéuticos, según se ha descrito antes, incluyendo el uso externo como antiinflamatorio. Sin embargo, hasta ahora, no había sido descrita la composición proporcionada por esta invención a base del aceite extraído de las semillas de Carapa guianensis Aublet y/o tetranortriterpenoides, compuestos químicos aislados desde este aceite y responsables de su actividad biológica, y vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, con actividad antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora, con efectos secundarios reducidos y de bajo coste, dada la procedencia desde materia prima nacional.

40 Esas composiciones farmacéuticas de esta invención se dirigen al tratamiento o prevención, o inhibición de los estados alérgicos e inflamatorios de seres humanos, mediante uso oral o uso tópico. En cada uno de estos casos la composición puede estar o bien en forma líquida o bien en forma sólida, y la composición de uso tópico puede estar también en forma semisólida. La composición farmacéutica de uso tópico, de esta invención, es atóxica o tiene toxicidad baja.

45 Las actividades antialérgica y antiinflamatoria de las composiciones farmacéuticas de esta invención, son debidas a su actividad antiedematógena.

50 Ha de apreciarse que en esta invención se pone de manifiesto la actividad antiedematógena del aceite extraído de las semillas de Carapa guianensis Aublet, así como también de tetranortriterpenoides, cuando se administran por vía oral. Igualmente, mediante aplicación tópica, las formulaciones que hacen uso del aceite de Carapa guianensis Aublet y/o de tetranortriterpenoides fueron capaces, asimismo, de inhibir el edema alérgico. Las composiciones de

esta invención de uso tópico son atóxicas, o presentan baja toxicidad, y son proporcionadas especialmente en forma semisólida (forma de crema),

5 En esta invención la actividad antialérgica de las composiciones farmacéuticas a base del aceite extraído desde las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y/o de los tetranortriterpenoides, compuestos químicos aislados desde este aceite y responsables de su actividad biológica, fue caracterizada por las actividades de estos compuestos como antihistamínicos, antagonistas de la bradiquinina y antagonistas del factor de agregación de las plaquetas, mediadores implicados en la respuesta inflamatoria, que fue observada en ensayos biológicos in vivo.

10 Ante los estímulos proinflamatorios, las composiciones farmacéuticas de la invención procedentes del aceite de *Carapa guianensis*, actúan inhibiendo la movilización celular, la proliferación de los linfocitos, la fagocitosis y la producción excesiva de proteínas.

15 La actividad inmunomoduladora y también antiinflamatoria, de las composiciones farmacéuticas de esta invención, fue caracterizada asimismo por la actividad inhibitoria de los tetranortriterpenoides sobre la producción de interferón-gamma, del factor de la necrosis tumoral (TNF), y de óxido nítrico, y también su actividad inmunomoduladora fue caracterizada por la inhibición sobre la proliferación inducida de linfocitos T, y sobre la fagocitosis por macrófagos murinos., siendo evidente que esta actividad es común a aceite extraído desde las semillas de *Carapa guianensis* Aublet, a partir del cual son aislados tetranortriterpenoides.

Por medio de la acción inhibitoria del aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y de los tetranortriterpenoides, se caracterizó una actividad analgésica sobre la hiperalgesia con las composiciones farmacéuticas de esta invención.

20 Además, se ha probado que las composiciones de esta invención presentan disminución de efectos secundarios.

25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención, además de presentar una alternativa terapéutica importante para el tratamiento de las alergias de la piel (por ejemplo, urticaria) y alergias respiratorias, actúan o bien en las diversas respuestas inflamatorias de origen alérgico, o también en las respuestas inflamatorias de origen infeccioso. Por tanto, estas composiciones son utilizadas también para el tratamiento sintomático de procesos reumáticos y degenerativos, traumas diversos, dolor e inflamación posoperatoria y síndromes dolorosos agudos, entre otros, y pueden ser administradas por vía oral o por vía tópica.

30 Los tetranortriterpenoides son conocidos. Estos compuestos son triterpenos que han perdido cuatro átomos de carbono (C-24, C-25, C-26 y C-27), habiéndose convertido los carbonos C-20, C-21, C-22 y C-23 en un anillo de furano. En esta mezcla de moléculas están incluidas las siguientes: 6 α -acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, angolensato de metilo, gedunina y 6 α -acetoxiepoxiazadiradión.

Debido al hecho de que los tetranortriterpenoides constituidos por la mezcla de los referidos compuestos, presentan, como se ha observado anteriormente, actividades antialérgica, antiinflamatoria, analgésica e inmunomoduladora, se puede considerar que sus constituyentes presentan también las mismas características.

35 Para la administración oral, la composición farmacéuticas de esta invención puede ser presentada en forma de polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas, o en forma de emulsiones, soluciones o suspensiones. Los componentes no activos incluyen, en este caso, excipientes, agentes de ligamiento, agentes de desintegración, diluyentes, lubricantes, etc.

40 Las composiciones sólidas contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes no tóxicos adecuados para la fabricación de comprimidos, tales como amidas, lactosa, ciertos tipos de carbonatos y bicarbonatos, fosfatos, talco, etc. Los comprimidos pueden estar recubiertos o no, dependiendo del tracto gastrointestinal en que puede tener lugar la desintegración y la absorción del medicamento.

En el caso de suspensiones, jarabes o soluciones fluidas, se emplean excipientes tales como metilcelulosa, alginato sódico, goma arábiga, lecitina, etc., y uno o más aditivos tales como agentes conservantes, colorantes, saborizantes, espesantes, polioles, sacarosa, glucosa, etc.

45 La composición farmacéutica de esta invención para uso tópico, puede tener la forma de crema, pomada, loción, gel, solución o suspensión. Los componentes no activos son los utilizados habitualmente en este caso.

Esta invención se describe con detalle por medio de los ejemplos que se presentan seguidamente. Es necesario notar que la invención no se limita a estos ejemplos, sino que incluye también variaciones y modificaciones dentro de los límites en que opera,

50 Ejemplos

Ejemplo 1:

Preparación de extractos.

(a) Aceite de Carapa guianensis Aublet

5 El aceite de Carapa guianensis utilizado en esta invención fue obtenido por expresión mecánica de semillas. Para usar en los experimentos, partes alícuotas del aceite fueron calentadas a 40°C hasta su fusión completa y diluidos en una solución salina y de Tween 20, estéril, en la proporción de 1 µl de Tween/mg de la masa total. Para la preparación de la solución de tratamiento, el aceite necesita ser calentado. Con la intención de garantizar la estabilidad química del producto, cada parte alícuota del aceite fue sometida a un calentamiento de 40°C hasta 2 veces.

(b) Tetranortriterpenoides

10 Los tetranortriterpenoides de la invención pueden ser obtenidos a partir del aceite de Andiroba o desde el bagazo de la semilla de Andiroba. Los procedimientos empleados en cada caso son procedimientos convencionales.

El aceite de Andiroba es extraído con acetonitrilo en tres etapas como mínimo, agitación y decantación, recogida del sobrenadante, y filtración del sobrenadante y evaporación en rotavapor.

15 Después de extracción del bagazo de la semilla de Andiroba con hexano de calidad plaguicida durante cinco días aproximadamente, ocho horas por día, el material permanece en reposo para que se deposite el material sólido. Después de esto, se lleva a cabo filtración y el material sólido se deposita en un recipiente provisto de rejilla para que se seque. Después se extiende y se deja secar.

Los tetranortriterpenoides se solubilizaron en una solución salina y de Tween 20, estéril, en la proporción de 1 µl de Tween/mg de masa total.

20 Las soluciones para administrar fueron preparadas en dosis de 12,5; 25; 50; 100 y 200 mg/Kg, en volúmenes de 200 µl (para los ratones) o de 400 µl (para las ratas).

Ejemplo 2

Preparación de soluciones, medicamentos y formulaciones

Las soluciones, medicamentos y formulaciones que se usaron en los experimentos realizados, se describen a continuación.

25 (a) Preparación de medicamentos

30 El cloruro de prometacina en comprimidos (Aventis) fue macerado, pesado y solubilizado en el seno de una solución estéril de NaCl al 0,9% preparada inmediatamente antes de usarla. La ciproheptadina (Sigma) se solubilizó en agua. La dipirona se diluyó y el diclofenaco se solubilizó en agua de nueva aportación 0,22 µm). La dexametasona (Sigma), WEB 2170 (Boehringer Ingelheim) y HOE 140 (Sigma) se solubilizaron en una solución estéril de NaCl al 0,9%. La prometacina en crema (Rhodia Farma) se aplicó directamente sobre las patas de los animales.

Todos los medicamentos fueron preparados inmediatamente antes de su uso.

(b) Preparación de soluciones

Solución salina

35	NaCl	0,9 g
	Agua destilada (q.s.p.)	100,00 ml

pH ajustado a 7,2-7,4.

Solución salina heparinizada

40	Solución salina	100,00 ml
	Heparina	2.000 UI

pH ajustado a 7,2-7,4.

Solución tampón de fosfato (PBS)

	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,256 g
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,004 g
	NaCl	8,766 g

ES 2 394 316 T3

	Agua destilada (q.s.p.)	1000 ml
	pH ajustado a 7,2-7,4	
	PBS heparinizada	
	PBS	1000 ml
5	Heparina	20.000 UI
	pH ajustado a 7,2-7,4.	
	PBS / Tween	
	Tween 20	50,0 µl
	PBS	100,0 ml
10	May-Grünwald	
	May-Grünwald	0,2 g
	Metanol	100,0 ml

Los compuestos anteriores se mezclan, se calienta a 60°C durante 2 horas y se filtra por papel de filtro.

	Giensa	
15	Giensa	1,0 g
	Glicerina	60,0 ml
	Metanol	56,0 ml.

Los compuestos anteriores se mezclan, se calienta a 60°C durante 2 horas y se filtra por papel de filtro. Para la solución de uso, la solución anterior se diluye 10 veces.

20	Líquido de Türk	
	Ácido acético glacial P.A.	2,0 ml
	Violeta cristal (q.s.p.)	5,0 mg
	Agua destilada (q.s.p.)	100,0 ml.
	RPMI / gentamicina	

25	RPMI	10,4 g
	Gentamicina	25 mg
	Agua desionizada (q.s.p.)	1,00 litro
	Reactivo de Greiss	

	Solución A		Solución B	
30	Sulfanilamida	1,0 g	α-Naftiletlenodiamina	100,00 mg
	H3PO4	5,0 ml	Agua destilada (q.s.p.)	100 ml
	Agua destilada (q.s.p.)	100,0 ml		

Se mezclan las Soluciones A y B, en partes iguales, (1:1) al tiempo de usarlas.

	XIX – PBS/Leche	
35	PBS/Leche, Sigma	3,0 g
	Agua destilada (q.s.p.)	100 ml
	Solución de exposición de ELISA	

OPD (Dihidrocloruro de

orto-fenilenodiamina 5,0 mg

Citrato 121,5 mg

Perborato sódico 30 mg

5 Agua destilada (q.s.p.) 10,0 ml.

Solución de ácido sulfúrico 2M

H₂SO₄ P.A. 166,67 ml

Agua destilada (q.s.p.) 1000,0 ml

(a) Preparación de formulaciones tópicas

10 Los componentes y sus porcentajes se describen en las formulaciones. Tales preparaciones pueden ser presentadas en forma de cremas y de lociones,

Aceite de Carapa guianensis	5 a 30 %
Tetranortriterpenoides	0 a 5%
Forma de emulsión (alcoholes y ácidos grasos y estearil lactato sódico)	0,5 a 6%
Vaselina sólida	0.2 a 2%
Agentes conservantes	0,05 a 0,1%
Humidificantes	2 a 20%
1,8-Cineol	0,1a 10%
Agua destilada, q.s.p.	100%

15 Los componentes oleosos (base emulsionada, humidificantes y agentes conservantes) se calentaron a 75°C y los componentes acuosos se calentaron hasta la temperatura de 80°C hasta su disolución total. Después de esto, se vertió una fase sobre la otra y se homogeneizó por agitación (2.000 rpm) hasta el enfriamiento completo de la formulación

Ejemplo 3:

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antialérgica del aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides, administrados por vía oral

20 Para todos los procedimientos operatorios realizados in vivo, descritos del modo que sigue, se emplearon ratones Swiss machos de peso entre 18 y 25 gramos y/o ratas Wistar machos, de peso entre 200 y 300 gramos. Los animales fueron proporcionados por la Central Biotery de la Fundación Oswaldo Cruz y mantenidos en el estabulario del Laboratorio de Farmacología Aplicada, Far-Manguinhos, hasta el momento de uso. Los animales tenían libre acceso a agua y la alimentación de los animales se sometió a ciclos alternados de 12 horas de iluminación y oscuridad, a la temperatura de 25°C. Los animales fueron tratados con un medicamento vermífugo (Mebendazol, 20 mg/1000 ml de agua) durante 3 días, y solamente fueron usados para la experimentación después de un intervalo de 3 días. Todos los procedimientos operatorios experimentales fueron llevados a cabo según la Ética de Experimentos con Animales de la Fundación Oswaldo Cruz, RJ.

a) Ensayo del edema de la pata

30 Los animales fueron estimulados mediante inyección interplantar del estímulo (histamina, bradiquinina y PAF (Factor de Activación de las Plaquetas) en una de las patas traseras, con volúmenes de 50 ó 100 µl/pata para los ratones o las ratas, respectivamente. Las dosificaciones usadas fueron: 100 µg/pata de histamina, 10 nmol/pata de bradiquinina y 1 µg/pata de PAF ((hay que hacer notar que solamente la bradiquinina se inyectó en un volumen de 50 µl). En el lado contralateral de la pata se aplicó el mismo volumen del vehículo (solución salina estéril exenta de pirogenos). Treinta minutos o una hora después del estímulo, se analizó el edema en un pletismógrafo digital, por medio del desplazamiento de fluido (0,5 g de NaCl; 3 ml de Extrán 100%/1 litro) producido, mediante la inserción de cada pata en la bandeja de medida. Cada análisis se realizó 3 veces.

b) Ensayo del edema alérgico de la pata

Este ensayo fue llevado a cabo en animales previamente sensibilizados mediante una inyección subcutánea (s.c.) en la región dorsal, de 200 µl de una suspensión que contenía 50 µg de albúmina de huevo + 5 mg de Al(OH)₃ diluido en solución salina estéril exenta de pirógenos (200 µl/animal). El edema de la pata fue inducido por una inyección intraplantar de albúmina de huevo (3 µg/pata, en un volumen final de 50 µl) en una de las patas traseras, catorce días después de la sensibilización. La pata contralateral recibió una inyección con el mismo volumen del vehículo (solución salina). El edema fue analizado en un pletismógrafo digital, por medio del desplazamiento de fluido (0,5 g de NaCl: 3 ml de Extrán 100%/1 litro) producido, por la inserción de la pata en ensayo en la bandeja de medida. Cada análisis se llevó a cabo 3 veces.

c) Ensayo del edema de la oreja

El edema de la oreja fue inducido en ratones anestesiados (pentobarbital, 40 mg/kg, vía intravenosa, 1.v.) con una inyección intravenosa (i.v.) de Azul de Evans al 1% (25 mg/kg), en el plexo orbital 24 horas antes del estímulo. Los animales fueron estimulados con una inyección intradérmica (i.d.) de histamina (10 µg/sitio en 25 µl) en la cara superior de la oreja, con jeringuillas de vidrio y agujas de diámetro 30 ½ G. La oreja opuesta a la estimulada recibió el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). Treinta minutos después del estímulo, los animales fueron sacrificados en la cámara de CO₂ y sus orejas fueron separadas y colocadas en formamida (500 µl/oreja) durante 24 horas para la extracción del Azul de Evans. La concentración de Azul de Evans en el sobrenadante se analizó por espectrofotometría (espectrofotómetro SpectraMax®) a λ 600 nm. La concentración de Azul de Evans se determinó comparando la densidad óptica (D.O.) de una curva patrón (desde 25,6 a 0,2 µg/ml).

d) Ensayo de pleuresía

La pleuresía fue inducida mediante inyección intratorácica (i.t.) de histamina (100 µg/cavidad) en un volumen final de 100 µl. El grupo testigo recibió 100 µl de vehículo (solución salina estéril). Una hora después del estímulo, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂, y sus cavidades torácicas fueron expuestas y lavadas con solución tampón de fosfato (PBS) heparinizada (20 UI/ml). La cavidad pleural de los animales se lavó con ayuda de una pipeta automática, con volúmenes de 1 y 3 ml, respectivamente, para los ratones y las ratas. Los lavados pleurales fueron recogidos y centrifugados (740 G, 10 minutos) para separar las células para la evaluación posterior de la exudación proteica, según se describe seguidamente. En experiencias realizadas con ratones, estos fueron inyectados previamente con Azul de Evans al 1% (25 mg/Kg), en el plexo orbital, y la exudación proteica fue evaluada por el exceso de Azul de Evans, por espectrofotometría a λ 600 nm. La concentración de Azul de Evans se determinó comparando la densidad óptica (D.O.) de los lavados con una curva patrón de Azul de Evans (de 25,6 a 0,2 µg/ml). Los resultados fueron expresados como µg/ml de Azul de Evans. Para el análisis en las ratas, la exudación del lavado pleural se evaluó por la medida del volumen recogido desde la cavidad con ayuda de una jeringuilla graduada, y la descarga de proteínas fue evaluada mediante la cuantificación de las proteínas existentes en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). El recuento del número de leucocitos totales existentes en el lavado pleural se llevó a cabo con ayuda de una cámara Neubauer sobre una parte alícuota del lavado pleural, diluida 40 veces en líquido de Türk para realizar la lisis de los eritrocitos. El recuento diferencial de células mononucleares, de neutrófilos y de eosinófilos, se realizó por medio de una torunda de algodón con las células coloreadas mediante el método de May-Grünwald, con ayuda del microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 x). Los resultados se expresan como el número de células (x 106) por cavidad.

e) Ensayo de la pleuresía alérgica

Este ensayo se llevó a cabo en animales previamente sensibilizados mediante inyección subcutánea (s.c.) en la región dorsal, de 200 µl de una suspensión que contenía 50 µg de albúmina de huevo + 5 mg de Al(OH)₃ diluido en solución salina estéril exenta de pirógenos (200 µl/animal). Catorce días después de la sensibilización, los animales fueron enfrentados con albúmina de huevo (12,5 µg/cavidad) por inyección i.t., en un volumen final de 100 µl. Los animales testigo recibieron un volumen igual de solución salina estéril. Una hora después del enfrentamiento con albúmina de huevo, las cavidades torácicas de los animales fueron expuestas y lavadas con 1 ml (ratones) o 3 ml (ratas) de PBS heparinizado (20 UI/ml). Se recogieron los lavados pleurales para evaluar la exudación proteica.

f) Tratamientos

Los tratamientos con aceite o tetranortriterpenoides fueron llevados a cabo por vía oral (p.o) 1 hora antes de la estimulación en animales conscientes, mantenidos en estado de ayuno previo de 12 horas, con libre acceso a agua. Las soluciones de tratamiento fueron administradas con ayuda de una aguja curva con final esférico, con volúmenes de 200 µl ó 400 µl para los ratones (de 25 g) o las ratas (de 200 g). Las dosis empleadas fueron 200 ó 400 mg/Kg para los ratones y 150 ó 300 mg/kg para las ratas. Los tetranortriterpenoides fueron administrados en dosis de 12,5; 25; 50; 100 y 200 mg/Kg. El tratamiento tópico con formulaciones a base de aceite de Carapa guianensis y/o tetranortriterpenoides se llevó a cabo con ayuda de una espátula y las patas tratadas fueron inmovilizadas durante 5 minutos para permitir la absorción de la crema. El tratamiento tópico se efectuó 30 minutos antes de la estimulación. Los inhibidores que figuran seguidamente fueron administrados por vía oral (p.o.) 1 hora antes del estímulo:

prometacina (antagonista competitivo de los receptores H1; 10, 30 ó 60 mg/Kg), ciproheptadina (antagonista serotoninérgico y de receptores H2, 30 mg/Kg), WEB 2170 (antagonista de PAF; 16 mg/Kg), dipirona (antiinflamatorio y antipirético; 100 mg/Kg) y diclofenaco de potasio (inhibidor de la ciclooxigenasa-1 y -2; 100 mg/Kg). Se administró dexametasona (antiinflamatorio; 2 mg/Kg, p.o.) 24 y 1 hora antes del estímulo, y se llevó a cabo una administración de HOE 140 (antagonista de la bradiquinina; 1 µg/pata) inmediatamente antes del estímulo, mediante inyección intraplantar.

Ejemplo 4:

Evaluación in vivo de la actividad antialérgica del aceite de *Carapa guianensis* administrado por vía oral

Para evaluar la actividad antialérgica del aceite de *Carapa guianensis*, se ensayaron las dosis de 200 y 400 mg/Kg para los ratones y 150 y 300 mg/Kg para las ratas, dependiendo del modelo ensayado. Las soluciones de tratamiento fueron administradas por vía oral (p.o.) 1 hora antes de la estimulación. Con fines de comparación se usó hidrocortisona de acetato, un antagonista competitivo de los receptores H1, como inhibidor de referencia. Los resultados fueron expresados como media y error típico de la media (AND.P.M.), y analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA), seguido de ensayo de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, o el ensayo de la T de Student con un nivel de significación menor o igual que 0,05 ($p \leq 0,05$).

La Figura 1 expone los resultados del tratamiento previo de ratones con aceite de *Carapa guianensis* en dosis de 100, 200, 300 y 400 mg/Kg en el modelo del edema alérgico de la pata. Cada barra muestra la media \pm AND.P.M. de al menos 7 animales. La barra abierta corresponde al grupo de animales que había recibido el estímulo interplantar con albúmina de huevo. La barra cerrada corresponde al grupo que había recibido tratamiento previo por vía oral con prometacina (testigo positivo), y las barras rayadas ilustran los animales tratados previamente con diferentes dosis de aceite. Todos los grupos fueron sensibilizados con albúmina de huevo 14 días antes del estímulo con la albúmina de huevo. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo testigo positivo ($p \leq 0,05$), según el ensayo de la T de Student y Newman Keuls. La Figura 1 pone de manifiesto que la inyección interplantar con albúmina de huevo (3 µg/pata) en los ratones había sido capaz de inducir edema de la pata, según informes de la bibliografía científica (Sampaio et al., 1995). Este edema fue inhibido significativamente mediante tratamiento con prometacina (30 mg/Kg) por vía oral. El tratamiento previo con aceite de *Carapa guianensis* fue capaz de inhibir significativamente el edema inducida por albúmina de huevo con dosis de 100, 200, 300 y 400 mg/Kg, sin mostrar diferencia entre las dosis.

Ejemplo 5:

Evaluación in vivo de la actividad antihistamínica del aceite de *Carapa guianensis* administrado por vía oral

Entre los mediadores responsables de la respuesta alérgica, la histamina desempeña un papel importante, que conduce al aumento de la permeabilidad vascular, la producción excesiva de proteica y edema (Bilici et al.). Por tanto, se analizó la actividad antihistamínica del aceite de *Carapa guianensis*. La Figura 2 presenta los resultados de tratamiento previo por vía oral del aceite de *Carapa guianensis* sobre el edema de la pata inducido por la estimulación intraplantar con histamina (100 µg/pata) en el ratón. Cada barra indica la media \pm AND.P.M. de 8 animales. La barra cerrada corresponde a la media del grupo estimulado con histamina (testigo positivo). La barra abierta corresponde a la media del grupo tratado previamente con prometacina (10 mg/Kg, p.o.), y las barras rayadas corresponden a los grupos tratados previamente con aceite de *Carapa guianensis*, en dosis de 100, 200, 300 y 400 mg/Kg. Los asteriscos indican los valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo testigo positivo ($p \leq 0,05$), según los ensayos de la T de Student y Newman Keuls. La Figura 2 pone de manifiesto que el tratamiento previo con aceite de *Carapa guianensis* había sido capaz de inhibir significativamente el edema de la pata inducido por histamina, en todas las dosis ensayadas, con la misma magnitud que el inhibidor de referencia (prometacina),

Después de esto se evaluó el efecto antihistamínico del aceite de *Carapa guianensis* en otro modelo experimental, el edema de la oreja. La Figura 3 muestra los resultados del tratamiento previo por vía oral con el aceite, en dosis de 200 y 400 mg/Kg, sobre el edema de la oreja inducido por histamina en animales sensibilizados. Cada barra indica la media \pm AND.P.M. de 7 animales. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo de solución salina (testigo negativo) y + indica diferencias con relación al grupo estimulado con histamina (testigo positivo) ($p \leq 0,05$), según los ensayos de la T de Student y Newman Keuls. La Figura 3 pone de manifiesto que la inyección de histamina fue capaz de inducir el exceso de producción proteica en las orejas de los ratones (segunda columna), y que el tratamiento previo por vía oral con prometacina (10 mg/Kg, p.o.) había podido inhibir significativamente el edema inducido por histamina (tercera columna). Igualmente, el tratamiento previo con dos dosis de aceite de *Carapa guianensis* (200 y 400 mg/Kg, p.o.) había sido capaz de inhibir significativamente el edema ocasionado por la inyección de histamina en el período de 30 minutos, en la misma magnitud que el inhibidor de referencia.

La evaluación de la actividad antihistamínica del aceite de *Carapa guianensis* se llevó a cabo también mediante el modelo de pleuresía (da Cunha et al., 2001; Calheiros et al., 2001). La Figura 4 muestra los resultados de tratamiento previo por vía oral con aceite, en dosis de 200 y 400 mg/Kg, sobre la exudación proteica en la pleuresía

inducida por histamina en ratones Swiss. Cada barra indica la media \pm AND.P.M. de 8 animales. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo que había recibido inyección i.t. de solución salina (testigo negativo) y + indica diferencia en relación con el grupo estimulado con histamina (testigo positivo) ($p \leq 0,05$), según el ensayo de la T de Student y de Newman Keuls. La Figura pone de manifiesto que la inyección de histamina (100 μ g/cavidad) había sido capaz de inducir producción proteica en exceso para la actividad pleural de los ratones (segunda columna), significativamente diferente de la del grupo testigo negativo. El tratamiento previo por vía oral con prometacina (30 mg/Kg, p.o.) (Tercera columna) fue capaz de inhibir el exceso de producción proteica inducido por histamina. Igualmente, el tratamiento previo con dos dosis de aceite de Carapa guianensis (200 y 400 mg/Kg, p.o.) había sido capaz de inhibir significativamente la exudación pleural inducida por histamina, con la misma magnitud que el inhibidor de referencia.

El mismo modelo experimental se empleó en ratas Wistar, como muestra la figura 5. En esta figura, cada barra corresponde a la media \pm AND.P.M. de 8 animales por lo menos. La primera barra corresponde a la media del grupo no estimulado (que había recibido inyección de solución salina), y los otros grupos habían sido estimulados con histamina (100 μ g/cavidad). La segunda barra corresponde a los animales sin tratar, la tercera a los animales tratados con el inhibidor de referencia (prometacina, 30 mg/Kg) por vía oral. Las otras barras corresponden a los grupos que habían recibido tratamiento previo con aceite de Carapa guianensis en dosis de 200 y 400 mg/Kg, por vía oral. Los asteriscos indican la diferencia estadística entre el grupo que había recibido inyección intratorácica de solución salina (testigo negativo) y + indica diferencias con respecto al grupo estimulado con histamina (testigo positivo) ($p \leq 0,05$), según el ensayo de la T de Student y de Newman Keuls. La figura pone de manifiesto que la inyección de histamina había sido capaz de inducir un exceso de producción proteica en la cavidad pleural de las ratas (segunda columna) significativamente diferente de la del grupo testigo negativo. El tratamiento previo por vía oral con dos dosis de aceite de Carapa guianensis (200 y 400 mg/Kg, p.o.) fue capaz de inhibir significativamente la producción proteica excesiva inducida por histamina, con la misma intensidad que la prometacina (30 mg/Kg, p.o.).

Ejemplo 6:

Evaluación in vivo de la actividad antialérgica de tetranortriterpenoides aislados del aceite de Carapa guianensis, administrados por vía oral.

La actividad antialérgica de los tetranortriterpenoides fue evaluada mediante el edema de la pata en ratones Swiss (figura 6). En la figura 6, cada barra indica la media \pm AND.P.M. de al menos 8 animales. Los resultados presentados demuestran el edema inducido por la inyección de albúmina de huevo (3 μ g/pata) en ratones sensibilizados (primera barra) y la inhibición del edema por tratamiento previo por vía oral con prometacina (30 mg/Kg, segunda barra). Las otras barras corresponden a grupos tratados previamente por vía oral con tetranortriterpenoides, y demuestran que dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg habían sido capaces de inhibir el edema alérgico, pero que las dosis de 12,5 y 25 mg/Kg no lo habían sido. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de Student Newman Keuls de comparaciones múltiples.

La actividad antialérgica de los tetranortriterpenoides fue evaluada también mediante el modelo de pleuresía alérgica (Penido et al., 2001; Sampaio et al., 2000). La Figura 7 indica los resultados del tratamiento previo por vía oral con tetranortriterpenoides en dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/l sobre la pleuresía inducida por albúmina de huevo en ratones Swiss, durante el período de 24 horas. Cada barra muestra la media \pm AND.P.M. de al menos 8 animales. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo que había recibido una inyección intratorácica de solución salina (testigo negativo) y + indica diferencias con respecto al grupo estimulado con albúmina de huevo (testigo positivo) ($p \leq 0,05$), según el ensayo de la T de Student y Newman Keuls. La figura pone de manifiesto que la inyección de albúmina de huevo (12 μ g/cavidad) había sido capaz de inducir producción proteica excesiva en la cavidad pleural de los ratones (segunda columna) significativamente diferente de la del grupo testigo negativo. La dexametasona es antiinflamatoria y la dosis de 2 mg/Kg (30 mg/Kg, p.o.) (tercera columna) fue capaz de inhibir significativamente la acumulación de células inducida por la albúmina de huevo. Igualmente, el tratamiento previo con los tetranortriterpenoides (dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg, p.o.) había sido capaz de inhibir significativamente la acumulación de leucocitos totales inducida por la albúmina de huevo, debido a la inhibición de la movilización de eosinófilos en la cavidad pleural, de la misma magnitud que el inhibidor de referencia.

Ejemplo 7:

Evaluación in vivo de la actividad antihistamínica de los tetranortriterpenoides aislados del aceite de Carapa guianensis, administrados por vía oral.

Después se evaluó la actividad antihistamínica de los tetranortriterpenoides mediante el modelo del edema de la pata, el edema de la oreja y la pleuresía. La figura 8 está relacionada con los resultados del tratamiento previo por vía oral con tetranortriterpenoides sobre el edema de la pata inducido por histamina en el ratón (a, 12,5; 25; 50; 100; y 200 mg/Kg) y en la rata (b, 12,5; 25; 50 y 100 mg/Kg). En el experimento con ratones se usó como inhibidor de referencia el antihistamínico hidrocloreuro de prometacina, por comparación, como testigo positivo. En el experimento con ratas, se usó ciproheptadina, un antagonista de la pareja de receptores de serotonina (5-HT₂) e histamina (H₁).

Cada barra muestra la media \pm AND. P.M. de 8 animales en la figura 8a, y de 5 animales en la figura 8b. Las barras abiertas indican las medias de animales estimulados con histamina que no habían recibido tratamiento (testigo positivo). Las barras cerradas corresponden a grupos estimulados con histamina, que habían recibido tratamiento previo por vía oral con inhibidores de referencia (prometacina, 30 mg/Kg para los ratones y ciproheptadina, 30 mg/Kg para las ratas). Las barras rayadas muestran grupos de animales estimulados con histamina y tratados previamente por vía oral con dosis diferentes de tetranortriterpenoides. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo testigo positivo. Como se ha demostrado anteriormente, la figura pone de manifiesto que la estimulación intraplantar con histamina fue capaz de inducir el edema en ratones (Sampaio et al., 1995) y en ratas (Henriques et al., 1991), y que este fenómeno había sido inhibido por los compuestos de referencia empleados. En los ratones, todas las dosis de tetranortriterpenoides ensayadas pudieron inhibir significativamente el edema de la pata inducido por histamina, mientras que en las ratas, solamente dosis superiores a 12,5 mg/Kg fueron capaces de inhibir esta reacción. Véase: Figura 8.

Después, se evaluó la actividad antihistamínica de los tetranortriterpenoides en el edema de la oreja del ratón (figura 9). En esta figura cada barra corresponde a la media \pm And.P.M. de 7 animales. El asterisco indica la diferencia estadística ($p \leq 0,05$) entre el grupo testigo negativo (inyectado con solución salina) y el testigo positivo (inyectado con histamina). + indica la diferencia estadística con respecto con el grupo testigo positivo.. La gráfica pone de manifiesto que la inyección de histamina había sido capaz de inducir exceso de producción de plasma en la oreja de los ratones 30 minutos después del estímulo (segunda barra), significativamente diferentes de la media del grupo inyectado con solución salina (primera barra). El tratamiento previo por vía oral con las dos dosis de tetranortriterpenoides (50 y 100 mg/Kg) pudo inhibir la formación de edema en la misma cantidad que el tratamiento previo con el inhibidor de referencia (prometacina, 10 mg/Kg, p.p.).

La figura 10 muestra el efecto antiedematógeno de los tetranortriterpenoides en el modelo de pleuresía inducida por histamina en el ratón. Cada barra corresponde a la media \pm AND.P.M. de 7 animales. El asterisco indica diferencia estadística ($p \leq 0,05$) entre el grupo testigo negativo (inyectado con solución salina) y el testigo positivo (inyectado con histamina). + indica diferencia estadística con respecto al grupo testigo positivo. Como pone de manifiesto la figura, la estimulación intratorácica con histamina (100 μ g/cavidad) había sido capaz de inducir exudación pleural en el período de 1 hora (segunda barra) en comparación con el grupo testigo negativo (primera barra). Las otras barras corresponden a las medias de grupos tratados previamente por vía oral con prometacina (30 mg/Kg, tercera barra) o con diferentes dosis de tetranortriterpenoides (25, 50, 100 y 200 mg/Kg, otras barras) y estimulados con histamina una hora después del tratamiento. Puede observarse que todas las dosis de tetranortriterpenoides habían podido inhibir la exudación plasmática de la cavidad torácica, sin diferencia estadística entre la media de los grupos tratados.

Ejemplo 8:

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antialérgica de formulaciones de cremas de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados del aceite de Carapa guianensis, administradas por vía tópica.

El análisis de la actividad antialérgica de formulaciones de cremas del aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados del aceite de Carapa guianensis, para uso tópico, fue llevado a cabo mediante la metodología del edema alérgico de la pata, en ratones Swiss y en ratas Wistar. Para este análisis, el tratamiento por vía tópica con una formulación particular de esta invención se llevó a cabo en una de las patas traseras de los animales. Es importante apreciar que en el estudio se incluyó un grupo testigo, que recibió el "blanco" (una formulación que contenía todos los excipientes, no provista del principio activo). La aplicación de la crema se efectuó con ayuda de una espátula, y las patas traseras fueron inmovilizadas durante 5 minutos para permitir la absorción de la crema. Treinta minutos después del tratamiento tópico, se efectuó la estimulación, mediante inyección intraplantar de albúmina de huevo (3 μ g/pata) en animales previamente sensibilizados. El análisis del edema se llevó a cabo treinta minutos después de la estimulación.

Ejemplo 9:

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antialérgica de formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados de aceites de Carapa guianensis, administradas por vía tópica.

La figura 11 se refiere a los resultados de tratamiento previo por vía tópica con formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, sobre el edema de la pata del ratón (A) o de la rata (B), inducido por albúmina de huevo (3 μ g/pata) en los ratones. En ambos experimentos se usó prometacina en crema como inhibidor de referencia. Cada barra muestra la media \pm AND.P.M. de 7 animales por grupo. La barra abierta muestra la media de los animales estimulados con albúmina de huevo que no habían recibido tratamiento (testigo positivo). Es importante observar que el tratamiento con la formulación testigo (excipientes) no indujo alteración alguna del volumen de las patas de los animales tratados. Las barras cerradas corresponden a los grupos estimulados con albúmina de huevo, que habían recibido tratamiento tópico previo con la crema de prometacina. Las barras rayadas muestran grupos de animales estimulados con albúmina de huevo y

tratados previamente con formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significantes ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo testigo positivo. La figura pone de manifiesto que la estimulación intraplantar con albúmina de huevo había podido inducir el edema en los ratones, y que este fenómeno había sido inhibido por la crema de prometacina. Como puede observarse, las formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados del aceite de Carapa guianensis, presentaban actividad antialérgica estadísticamente significativa cuando se aplicaron a las patas de los ratones treinta minutos antes de la estimulación por albúmina de huevo. (Las formulaciones H e I también pusieron de manifiesto buenos resultados en las ratas).

10 **Ejemplo 10:**

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antihistamínica de formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, administradas por vía tópica.

El análisis de la actividad antiinflamatoria de formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, para uso tópico, se realizó por medio de la metodología del edema de la pata en ratones Swiss y en ratas Wistar. Para este análisis se llevó a cabo un tratamiento tópico en las patas traseras de los animales con una formulación de ensayo. La formulación que contenía todos los excipientes, pero que no contenía principio activo, (blanco) se administró al grupo testigo. La aplicación de la crema se efectuó con ayuda de una espátula, y las patas traseras fueron inmovilizadas durante 5 minutos para permitir la absorción de la crema. Treinta minutos después del tratamiento tópico, se llevó a cabo una estimulación, mediante la inyección intraplantar de histamina (100 μg /pata). El análisis del edema se realizó treinta minutos después de la estimulación.

15 **Ejemplo 11:**

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antihistamínica de formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, administradas por vía tópica

La figura 12 se refiere a los resultados del tratamiento previo por vía tópica con formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, sobre el edema de la pata inducido por histamina en el ratón (Aa) y en la rata (Bb). En ambos experimentos, se usó prometacina en crema como inhibidor de referencia (testigo positivo). Cada barra muestra la media \pm AND.P.M. de 8 animales en la figura 12(A) y de 5 animales en la figura 12(B). Las barras abiertas muestran las medias de los animales estimulados con histamina que no habían recibido tratamiento (testigo positivo). Es importante apreciar que el tratamiento con la formulación testigo (excipientes) no indujo alteración alguna del volumen de las patas de los animales tratados. Las barras cerradas corresponden a grupos estimulados con histamina, que habían recibido tratamiento previo por vía tópica con crema de prometacina. Las barras rayadas presentan grupos de animales estimulados con histamina y tratados previamente con formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo testigo positivo. La figura pone de manifiesto que la estimulación intraplantar con histamina pudo inducir el edema en los ratones y en las ratas, y que este fenómeno había sido inhibido por la crema de prometacina. Como puede apreciarse, las formulaciones de cremas a base de aceite de Carapa guianensis y de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis presentaban una actividad antihistamínica estadísticamente significativa cuando se aplicaron tópicamente a las patas de los ratones y de las ratas treinta minutos antes de la estimulación con histamina. (La figura 12 expone solamente los resultados de los ratones (A); los resultados de las ratas están ausentes (B)).

45 **Ejemplo 12:**

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antiinflamatoria del aceite de Carapa guianensis administrado por vía oral

La actividad antiinflamatoria del aceite de Carapa guianensis fue evaluada por medio del edema de la pata y de la pleuresía, inducidos por diferentes estímulos, que se describen como sigue. en ratones Swiss machos-

50 a) Ensayo del edema de la pata

Los animales fueron estimulados mediante inyección intraplantar del estímulo (zimosán o carragenina) en una de sus patas traseras, con un volumen de 50 μl /pata). Las dosis usadas fueron: 500 μg /pata de zimosán y 300 μg /pata de carragenina. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina exenta de pirógenos). Cuatro horas después del estímulo, se analizó el edema en el pletismógrafo digital, por medio del desplazamiento de fluido (0,5 g de NaCl; 3 ml d Extrán 100%/ 1 litro) producido, por inserción de cada pata en la bandeja de medida. Cada análisis se llevó a cabo 3 veces.

b) Ensayo de pleuresía

Se indujo pleuresía mediante inyección intratorácica (i.t.) de carragenina (300 µg/cavidad) en un volumen final de 100 µl (Henriques et al., 1991).. El grupo testigo recibió 100 µl de vehículo (solución salina estéril). Cuatro horas después del estímulo los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂, sus cavidades pleurales torácica fueron expuestas y lavadas con solución tampón de fosfato (PBS) heparinizada (20 UI/ml). La cavidad pleural de los animales se lavó con ayuda de una pipeta automática, con un volumen de 1 ml. El lavado de la cavidad pleural se recogió y se centrifugó (740 g, 10 minutos) para separar las células para la evaluación posterior de la exudación proteica, según se describe como sigue. Los ratones fueron inyectados previamente por vía intravenosa en su plexo orbital con azul de Evans al 1% (25 mg/Kg), y la exudación proteica se evaluó por medio de la descarga de azul de Evans, medida por espectrofotometría a λ 600 nm. La concentración de azul de Evans se determinó comparando la densidad óptica (D.O.) de los lavados con una curva patrón de azul de Evans (desde 25,6 hasta 0,2 µg/ml). Los resultados fueron expresados como µg/ml de azul de Evans. El recuento del número de leucocitos totales de la cavidad pleural se efectuó con ayuda de una cámara de Neubauer de una parte alícuota del lavado pleural diluida 40 veces con líquido de Türk para la lisis de los eritrocitos. El recuento diferencial de células mononucleares, de neutrófilos y de eosinófilos, se hizo mediante torundas de recogida de las células coloreadas por el método de May-Grünwald-Giemsa, con ayuda de un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 x). Los resultados son expresados como el número de células (x 106) por cavidad.

Ejemplo 13:

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antiinflamatoria del aceite de Carapa guianensis administrado por vía oral.

La actividad antiinflamatoria de los tetranortriterpenoides se evaluó mediante el edema de la pata y la pleuresía, en ratones Swiss. En las figuras 13 y 14, cada barra expone la media ± AND.P.M. de 8 animales por grupo. Las columnas abiertas muestran las medias de los volúmenes de las patas de los animales de los grupos estimulados por la inyección de carragenina (300 µg/pata, fig. 13) o zimosán (500 µg/pata, fig. 14) y las barras cerradas corresponden a la inhibición del edema por tratamiento previo por vía oral con diclofenaco (100 mg/Kg, segunda barra). Las otras barras corresponden a grupos tratados previamente por vía oral con aceite de Carapa guianensis y demuestran que las dosis de 100 y 400 mg/Kg pudieron inhibir el edema inducido por zimosán, y que una dosis de 100 mg/Kg pudo inhibir el edema inducido por carragenina. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p≤0,05) con respecto al grupo estimulado y sin tratar, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

La actividad antiinflamatoria del aceite de Carapa guianensis se evaluó también mediante el modelo de pleuresía. La figura 15 ilustra los resultados del tratamiento previo por vía oral con aceite de Carapa guianensis en dosis de 100, 200, 300 y 400 mg/Kg, sobre la pleuresía inducida por carragenina en ratones Swiss durante el período de 4 horas. Cada barra muestra la media ± AND.P.M. de al menos 7 animales. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo que había recibido inyección intratorácica de solución salina (testigo negativo) y + indica diferencias con respecto al grupo estimulado con carragenina (testigo positivo) (p≤0,05) según el ensayo de la T de Student y Newman Keuls. La figura pone de manifiesto que la inyección de carragenina (300 µg/cavidad) pudo inducir una producción proteica excesiva en la cavidad pleural de los ratones (segunda columna) significativamente diferente de la del grupo testigo negativo. El tratamiento previo por vía oral con diclofenaco (100 mg/Kg, p.o.) (tercera columna) pudo inhibir de modo importante la superproducción proteica inducida por carragenina, como la dosis de 400 mg/kg de aceite de Carapa guianensis. La inyección de carragenina pudo, también, inducir la acumulación de leucocitos en el foco inflamatorio (B y C, segunda barra). El tratamiento previo con aceite de Carapa guianensis a la dosis de 400 mg/Kg, fue capaz, asimismo, de inhibir significativamente la acumulación de leucocitos totales inducida por carragenina, debido a la inhibición de la movilización de eosinófilos en la cavidad pleural, de la misma magnitud que el inhibidor de referencia.

Ejemplo 14:

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antiinflamatoria de los tetranortriterpenoides administrados por vía oral.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, por el edema de la pata de ratones Swiss y de ratas Wistar, inducido por diferentes estímulos, mediante los ensayos que siguen:

a) Ensayo del edema de la pata inducido por el factor activador de plaquetas.

Ratones Swiss fueron estimulados mediante inyección intraplantar de 1 µg/pata de factor activador de plaquetas (PAF) en una de las patas traseras, en un volumen de 50 µl/pata. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). La estimulación se llevó a cabo en animales sin tratar y en animales tratados previamente con 16 mg/Kg del antagonista del PAF WEB 2170 (p.o., 100 µl). Treinta minutos después del estímulo el edema se analizó mediante el pletismógrafo digital, por el desplazamiento de fluido

(0,5 g de NaCl; 3 ml de Extrán 100%/ 1 litro) producido, por inserción de cada pata en la bandeja de medida. Cada análisis se llevó a cabo 3 veces.,

b) Ensayo del edema de la pata inducido por bradiquinina

5 Ratas Wistar fueron estimuladas por inyección intraplantar de 10 nmol/pata de bradiquinina (BK) en una de las patas traseras, en un volumen de 50 μ l/pata (Henriques, 1951). En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). La estimulación se llevó a cabo en animales sin tratar y en animales tratados previamente mediante una inyección intraplantar de 10 nmol/pata del antagonista de bradiquinina HOE 140, en un volumen de 50 μ l. Treinta minutos después del estímulo se analizó el edema en el pletismógrafo digital, por el desplazamiento de fluido (0,5 g de NaCl; 3 ml de Extrán 100%/1 litro) producido, por inserción de cada pata en la bandeja de medida. Cada análisis se llevó a cabo 3 veces.

Ejemplo 15:

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad antiinflamatoria de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis*, administrado por vía oral.

15 En la figura 16, cada barra muestra la media \pm E.P.M. de 7 animales. Los resultados presentados demuestran el edema inducido por inyección intraplantar de factor activador de plaquetas (PAF, 1 μ g/pata) en ratones Swiss (primera barra) y la inhibición del edema por tratamiento previo por vía oral con el antagonista de PAF, WEB 2170 (16 mg/Kg, segunda barra). Las otras barras corresponden a grupos tratados previamente por vía oral con los tetranortriterpenoides, y demuestran que las dosis de 15, 50 y 100 mg/Kg habían podido inhibir el edema inducida por PAF, pero no lo había hecho la dosis de 12,5 mg/Kg, Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

25 En la figura 17, cada barra expone la media \pm E.P.M. de 7 animales. Los resultados presentados demuestran el edema inducido por inyección intraplantar de bradiquinina (10 nmol/pata) en ratas Wistar (primera barra) y la inhibición del edema por tratamiento intraplantar previo con el antagonista de la bradiquinina, HOE 140 (10 nmol/pata, intraplantar, segunda barra). Las otras barras corresponden a los grupos tratados previamente por vía oral con tetranortriterpenoides, y demuestran que las dosis de 12,5, 25, 50 y 100 mg/Kg, podían inhibir el edema inducido por bradiquinina. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

Ejemplo 16:

30 Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad analgésica del aceite de *Carapa guianensis* administrado por vía oral.

35 Se evaluó la actividad antialérgica por medio de un ensayo de hiperalgesia, llevado a cabo en una placa calentada (Hot Plate, Ugo Basile-Italia, modelo DS-37), con ratas Wistar. El ensayo se realizó por colocación de los animales sobre la placa caliente, limitada por una cúpula acrílica de aproximadamente 12 cm de diámetro por 40 cm de altura.

a) Hiperalgesia de respuesta alérgica

40 La inducción del estado de hiperalgesia se llevó a cabo por inyección intraplantar de 10 nmol/pata de albúmina de huevo en animales previamente sensibilizados (12 μ g/pata) en una de las patas traseras de ratas Wistar, en un volumen final de 100 μ l/pata. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). La aplicación del estímulo se llevó a cabo en animales sin tratar y en animales previamente tratados con diclofenaco (100 mg/Kg, p.o.). Una hora después del estímulo los animales fueron colocados sobre una placa caliente a $52,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se fijaron dos cronómetros para registrar la latencia de respuesta de retirada de la placa de cada pata trasera. Los resultados fueron expresados en términos de la variación del periodo latente de retirada de las patas de lado derecho y del lado izquierdo, medido en segundos.

45 b) Hiperalgesia inducida por histamina

50 La inducción de un estado de hiperalgesia se realizó por inyección intraplantar de 100 μ g/pata de histamina en ratas Wistar, en una de las patas traseras, en el volumen final de 100 μ l/pata. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). El estímulo se llevó a cabo en animales sin tratar y en animales tratados previamente con prometacina (30 mg/Kg, p.o.). Treinta minutos después del estímulo, los animales fueron colocados en una placa caliente a $52,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se fijaron dos cronómetros para registrar el período latente de respuesta de retirada de cada pata trasera. Los resultados fueron expresados en términos de variación de la latencia de retirada de las patas del lado izquierdo y del lado derecho, medida en segundos.

c) Hiperalgesia inducida por carragenina

La inducción de un estado de hiperalgnesia se realizó por inyección intraplantar de 600 µg/pata de carragenina en ratas Wistar, en una de las patas traseras, en el volumen final de 100 µl/pata. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). El estímulo se llevó a cabo en animales sin tratar y en animales tratados previamente con dipirona (100 mg/Kg, p.o.). Tres horas después del estímulo, los animales fueron colocados en una placa caliente a $52,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se fijaron dos cronómetros para registrar el período latente de respuesta de retirada de cada pata trasera. Los resultados fueron expresados en términos de variación de la latencia de retirada de las patas del lado izquierdo y del lado derecho, medida en segundos.

Ejemplo 17:

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad analgésica del aceite de Carapa guianensis administrado por vía oral.

En la figura 18, cada barra muestra la media \pm E.P.M. de 7 animales. Los resultados presentados demuestran hiperalgnesia inducida por inyección intraplantar de albúmina de huevo (12 µg/pata) en ratas Wistar (segunda barra) y la inhibición de hiperalgnesia por tratamiento previo con diclofenaco (100 mg/Kg, p.o.) (tercera barra). Las otras barras corresponden a grupos tratados previamente por vía oral con aceite de Carapa guianensis, y demuestran que las dosis de 100, 200 y 400 mg/Kg pudieron inhibir el estado de hiperalgnesia inducido por la albúmina de huevo. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo sin estimular, y + pone de manifiesto una diferencia estadística entre el grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

La figura 19 muestra la hiperalgnesia inducida por inyección intraplantar de histamina (100 µg/pata) en ratas Wistar. Cada barra indica la media \pm E.P.M. de 7 animales. Una tercera barra indica la inhibición de hiperalgnesia por tratamiento previo con prometacina (30 mg/Kg, p.o.). Las otras barras corresponden a los grupos tratados previamente por vía oral con aceite de Carapa guianensis (en dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/Kg). Solamente la dosis de 400 mg/Kg fue capaz de inhibir el estado de hiperalgnesia inducido por histamina, en la misma intensidad que el inhibidor de referencia. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo sin estimular, y + pone de manifiesto la diferencia estadística entre el grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

En la figura 20, cada barra indica la media \pm E.P.M. de 7 animales. Los resultados presentados demuestran hiperalgnesia inducida por inyección intraplantar de carragenina (800 mg/pata) en ratas Wistar (segunda barra) y la inhibición de hiperalgnesia por tratamiento previo con dipirona (100 mg/Kg, p.o., tercera barra). Las otras barras corresponden a los grupos tratados previamente por vía oral con aceite de Carapa guianensis (en dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/Kg). Las dosis de 100, 200 y 400 mg/Kg pudieron inhibir el estado de hiperalgnesia inducido por carragenina. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo sin estimular, y + indica una diferencia estadística entre el grupo estimulado y no tratado, según el ensayo de comparaciones múltiples de Student Newman Keuls.

Ejemplo 18:

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la actividad analgésica de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, administrados por vía oral.

a) Hiperalgnesia inducida por histamina

La inducción de un estado de hiperalgnesia se llevó a cabo por inyección intraplantar de 100 µg/pata de histamina en ratas Wistar, en una de las patas traseras, en un volumen final de 100 µl/pata. En la pata contralateral se inyectó el mismo volumen de vehículo (solución salina estéril exenta de pirógenos). El estímulo se efectuó en animales sin tratar y en animales tratados previamente con ciproheptadina (30 mg/Kg, p.o.). Treinta minutos después del estímulo los animales fueron colocados en una placa caliente a $52,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, y se fijaron dos cronómetros para registrar el período latente de respuesta de retirada de la placa de cada una de las patas traseras. Los resultados fueron expresados en términos de variación de la latencia de retirada de las patas del lado izquierdo y derecho, medida en segundos.

Ejemplo 19:

Evaluación de ensayos in vivo que se refieren a la actividad analgésica de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis, administrados por vía oral

En la figura 21, cada barra indica la media \pm E.P.M. de 7 animales. La primera barra de la figura expone la inducción del estados de hiperalgnesia, y una segunda barra su inhibición por tratamiento previo con el inhibidor de referencia (ciproheptadina, 30 mg/Kg, p.o.). Las otras barras ponen de manifiesto que el tratamiento previo con tetranortriterpenoides en dosis de 12,5, 25, 50 y 100 mg/Kg, había podido inhibir la hiperalgnesia inducida por histamina.

Ejemplo 20:

Metodología de ensayos in vitro con referencia a la actividad inmunomoduladora antiinflamatoria de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis.

a) Ensayo de producción de NO

5 Ratones Balb/c recibieron una inyección intraperitoneal de tioglicolato al 3% (1 ml) y 72 horas después se recogieron los macrófagos peritoneales por lavado con 5 ml de medio RPMI 1640 estéril. Las células obtenidas desde el peritoneo fueron depositadas en una placa de 96 pocillos (2,5 x 10⁵ células/pocillo) e incubadas durante 1 hora en una estufa de CO₂. Después de este período, se recogieron las células no adherentes por lavado y las células adherentes fueron estimuladas con LPS (37,5 ng/ml) en un medio rico en interferón y/o con tetranortriterpenoides (1, 10, 100 µg/ml) e incubadas durante 24 horas en una estufa de CO₂. Parte del sobrenadante libre de células fue recogido después de centrifugar (2 min; 2800 rpm), transferido (100 µl) a otra placa en la que se añadió reactivo de Greiss (100 µl). La determinación de la concentración de nitrito se llevó a cabo en un microlector de placas a 540 nm, por comparación con una curva patrón de nitrito sódico. Los resultados obtenidos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA, Student-Newman-Keuls o el ensayo de la T de Student. Los resultados fueron expresados como media ± error típico de la media (E.P.M). Los valores de p ≤ 0,05 fueron considerados significativos,

b) Producción de interferón-γ por esplenocitos

20 Bazos de ratones Balb-c machos fueron extraídos en una zona estéril, y llevados a una placa de Petri que contenía 3 ml de medio RPMI 1640 con gentamicina (25 µg/ml). En una cabina de flujo laminar los bazos fueron disociados individualmente. Las suspensiones de células fueron reunidas en un pool en tubos de 15 ml estériles. La suspensión se dejó sedimentar durante 5 minutos y después de este período se recogió el sobrenadante. La suspensión de células se centrifugó durante 10 minutos a 400 g, y el agregado de células fue resuspendido con 4 ml de medio RPMI 1640/gentamicina. En otro tubo se colocaron 2 ml de histopaque 1072 y después la suspensión de células. Después de centrifugar durante 30 minutos a 400 g, las células situadas en la interfase entre el medio de cultivo y el histopaque 1077 fueron recogidas, lavadas (10 minutos a 1500 rpm) y resuspendidas en 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado para realizar el recuento de la viabilidad celular por el método del azul tripán.

25 Después de obtener y contar la viabilidad celular, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (2,5 x 10⁵/pocillo), incubadas durante 30 minutos y se añadió Con A (0,4 µg/pocillo) en presencia o no de la muestra de ensayo (1, 10, 100 µg/ml). Para determinar la producción de IFN-γ, las células fueron mantenidas en cultivo durante 24 horas después de la estimulación, se centrifugó la placa (2 minutos; 2800 rpm) y el sobrenadante, libre de células, se recogió para la valoración del IFN-γ por el método ELISA.

C) Ensayo de producción de TNF-α

35 Ratones Balb/c recibieron una inyección intraperitoneal de tioglicolato al 3% (1 ml) y 72 horas después se recogieron los macrófagos peritoneales por lavado con 5 ml de medio RPMI 1640 estéril. Las células obtenidas desde el peritoneo fueron sembradas en una placa de 96 pocillos (2,5 x 10⁵ células/pocillo) e incubadas durante 1 hora en una estufa de CO₂. Después de este período, se recogieron las células no adherentes por lavado y las células adherentes fueron estimuladas con LPS (37,5 ng/ml) y/o tetranortriterpenoides (1, 10, 100 µg/ml) e incubadas durante 24 horas en una estufa de CO₂. Después de este período la placa se centrifugó (2 minutos, 2800 rpm) y se recogió parte del sobrenadante exento de células (100 µl) y se distribuyó en partes alícuotas para valorar el TNF-α por el método ELISA.

d) Valoración de TNF-α o TNF-γ por el método ELISA de captura

45 Para la valoración de citoquinas, 4 µg/ml de anticuerpo monoclonal purificado anti-TNF-α o anti-TNF-γ, se diluyeron con solución tampón de Na₂HPO₄ (0,1 M; pH 9,2), se distribuyó en una placa de 96 pocillos (50 µl/pocillo; Maxisorp NUNC) y se incubó a 4°C durante 18 horas. Después de este período la placa se lavó con PBS Tween (0,05%) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada-PBS al 3% (100 µl/pocillo). Después de un nuevo lavado con PBS-Tween (0,05%; PBS-T), la placa se incubó con sobrenadantes duplicados (100 µl) y se incubó a 4°C durante 18 horas. Al cabo de 24 horas, la placa se lavó con PBS-T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µl de anticuerpo monoclonal biotinilado anti-TNF-α o anti-TNF-γ (0,4 µg/ml). La placa se lavó luego con PBS-T y se incubó con 50 µl de estreptoavidina peroxidasa (dilución 1:800) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La exposición se llevó a cabo mediante la adición de 100 µl de solución tampón de citrato/perborato de sodio que contenía OPD (0,5 mg/ml). El bloqueo de la respuesta se llevó a cabo mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 2 M, y la lectura se efectuó en un espectrofotómetro a 490 nm. La concentración de citoquinas en el sobrenadante se determinó por comparación con una curva patrón de TNF-α o TNF-γ recombinantes, mediante el programa de análisis Soft Max Pro. Los datos de los resultados obtenidos fueron analizados por análisis de la varianza ANOVA, Student-Newman-Keuls o el ensayo de la T de Student. Los

resultados fueron expresados como media \pm error típico de la media (E.P.M). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

e) Ensayo de proliferación de linfocitos

5 Se obtuvieron esplenocitos según se ha descrito en el apartado b de este ejemplo. $2,5 \times 10^6$ células fueron sembradas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 30 minutos en una estufa a 37°C y se añadió CO_2 al 5% como ensayos de muestras (0,1- 100 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o no de Concanavalina A (Con A, 0,4 $\mu\text{g/pocillo}$). Las células fueron mantenidas en la estufa y después de 72 horas se añadió 1 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de timidina tritiada. Después de 18 horas de la adición de timidina, las células fueron transferidas a una membrana con ayuda de Cell Harvester (Packard). La lectura de la radiactividad se llevó a cabo por centelleo (TopCount NXT; Packard) y los resultados obtenidos fueron expresados como cuentas por minuto (CPM). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el análisis de la varianza ANOVA, Student-Newman-Keuls o el ensayo de la T de Student. Los resultados fueron expresados como media \pm error típico de la media (E.P.M). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

f) Ensayo de fagocitosis

15 Para el análisis del grado de fagocitosis de los macrófagos, se emplearon placas de 24 pocillos que contenían en cada pocillo una lámina de vidrio de 13 mm de diámetro. Para usar las láminas se lavaron previamente con una solución al 0,1% de Extrán Neuter (Merck), y fueron calentadas durante 35 minutos aproximadamente. La operación se duplicó con agua destilada, Las láminas se secaron en una estufa y se sumergieron durante 18 horas en una solución de ácido nítrico al 0,1%, Después de este tratamiento fueron enjuagas con agua destilada, secadas en estufa e irradiadas (2500 rad). 2×10^5 células/pocillo fueron sembradas en presencia de $\text{IFN-}\gamma$ (10 Unidades/ml), tetranortriterpenoides (100 $\mu\text{g/ml}$) o como testigo, medio RPMI 1640 suplementado. Al cabo de 1 hora en la estufa a 37°C (5% de CO_2), se añadió 50 μl de zimosán (concentración final de 106 partículas/ml). Esta suspensión de zimosán se preparó con una concentración 2,5 mg/ml en el seno de PBS estéril, se centrifugó durante 15 minutos (3500 rpm), y el agregado se volvió a suspender en 1 ml de PBS estéril. Después de someter a ultrasonidos (10 minutos), se separó una parte alícuota de la suspensión y se diluyó para contar el número de partículas exentas de zimosán, en la cámara de Neubauer con microscopio óptico (objetivo de 20 aumentos). Después de la adición de zimosán, el cultivo se llevó de nuevo a la estufa durante 1 hora más. Después de este período las láminas fueron procesadas para evaluar la fagocitosis. Para la evaluación de las láminas, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos. Después de un nuevo lavado, las células fueron coloreadas con Hematoxilina-Eosina. Una vez coloreadas, las láminas fueron lavadas con agua de nueva aportación, colocadas sobre un porta y llevadas al microscopio para efectuar el recuento de las células.

Con objeto de cuantificar el grado de fagocitosis se contó el número de partículas encontradas en 200 células. Las células que presentaban en su interior un número igual o mayor que 4 partículas de zimosán, fueron aceptadas como positivas de fagocitosis. Los resultados fueron expresados como porcentaje de fagocitosis con respecto al grupo testigo mediante la fórmula que sigue:

Nº de células positivas en el grupo tratado

$$\text{Fagocitosis (\%)} = \frac{\text{Nº de células positivas en el grupo tratado}}{\text{Nº de células positivas en el grupo del medio}} \times 100$$

Nº de células positivas en el grupo del medio

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el análisis de la varianza ANOVA, Student-Newman-Keuls o el ensayo de la T de Student. Los resultados fueron expresados como media \pm error típico de la media (E.P.M). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos

Ejemplo 21:

Evaluación de ensayos in vitro que se refieren a la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de los tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis.

45 a) Evaluación de la influencia de tetranortripernoides aislados desde el aceite de Carapa guianensis sobre la producción de óxido nítrico.

El primer modelo experimental in vitro utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria de los tetranortriterpenoides fue el modelo de producción de óxido nítrico por los macrófagos peritoneales. En la figura 22, cada columna ilustra la media de una experimento de demostración realizado por duplicado y los asteriscos y las cruces indican $p \leq 0,05$ comparados respectivamente con los valores de grupos sin estimular (columna abierta) o con los valores del grupo estimulado con LPS en un medio acondicionado (columna cerrada)

Se observó la producción de óxido nítrico inducida por estimulación durante 24 horas con LPS (30 mg/ml) y un medio rico en interferón (columna cerrada), la producción basal de óxido nítrico (primera columna abierta) y el efecto de los tetranortriterpenoides (1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) (columna rayada). La producción basal (tercera a quinta columnas)

de óxido nítrico fue inhibida significativamente con la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$, y la dosis máxima fue 100 $\mu\text{g/ml}$. En los grupos estimulados con LPS y con un medio rico en interferón se observó una inhibición discreta de la producción de óxido nítrico en dosis de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetranortriterpenoides, sin embargo, el tratamiento con una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ pudo reducir la producción de óxido nítrico a valores inferiores al valor basal.

- 5 b) Evaluación de la influencia de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* sobre la producción de interferón- γ y TNF- α .

La evaluación de la actividad antiinflamatoria y de inmunomodulación se efectuó mediante la producción de IFN- γ por esplenocitos y de TNF- α por los macrófagos peritoneales murinos. En las figuras 23 y 24, cada columna muestra la media de los replicados de un experimento de demostración, y los asteriscos y las cruces indican $p \leq 0,05$ cuando se compararon, respectivamente, con los valores del grupo sin estimular (columna abierta) o con los valores del grupo estimulado (columna cerrada). La producción de IFN- γ por los esplenocitos murinos fue evaluada 24 horas después de la estimulación con Con-A (0,4 $\mu\text{g/pocillo}$) en presencia o no de dosis crecientes de tetranortriterpenoides (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$). También se analizó el efecto de los tetranortriterpenoides sobre la producción basal de IFN- γ . En la figura 23 se observa que el tratamiento con tetranortriterpenoides no había alterado la producción basal de IFN- γ (tercera a quinta columnas). La estimulación con Con-A induce la producción de IFN- γ ($p \leq 0,05$) en 24 horas y el tratamiento con tetranortriterpenoides había inhibido significativamente ($p < 0,05$) la producción de esta citoquina. En el modelo de producción de TNF- α por los macrófagos murinos, se observó que el tratamiento con tetranortriterpenoides (cuarta a séptima columnas, figura 24) no había alterado la producción basal de TNF- α (columna abierta). El glucocorticoide dexametasona (0,005 μM ; tercera columna) inhibió significativamente la producción de TNF (300 ng/ml; columna cerrada) por macrófagos estimulados con LPS (30 ng/ml) durante 24 horas; sin embargo, el tratamiento con tetranortriterpenoides no pudo alterar la producción basal de TNF- α , pero fue capaz de inhibir ($p < 0,05$) en dosis de 0,01, 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, la producción de esta citoquina inducida por LPS.

c) Evaluación de la influencia de los tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* sobre la proliferación de linfocitos.

25 En la figura 25 cada columna muestra la media de experimentos de demostración replicados, y los asteriscos y las cruces indican $p \leq 0,05$ al comparar, respectivamente, con las del grupo sin estimular (columna abierta; primera columna) o con las del grupo estimulado con Con-A (0,4 $\mu\text{g/pocillo}$; columna cerrada). Se observa que la incubación de linfocitos con los tetranortriterpenoides no pudo alterar la proliferación basal de linfocitos in vitro (cuarta a octava columnas) y que la estimulación durante 72 horas con Con-A induce la proliferación de linfocitos (columna cerrada).
30 El tratamiento previo con tetranortriterpenoides inhibió ($p < 0,05$) en dosis de 0,1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (columnas nueve a trece) la proliferación de linfocitos inducida por Con-A. El tratamiento con dexametasona (0,005 μM) inhibió significativamente la proliferación de linfocitos ($p < 0,05$).

d) Evaluación de la influencia de los tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* sobre la fagocitosis por macrófagos murinos.

35 Con objeto de evaluar la modulación de la actividad de macrófagos, se analizó el efecto de los tetranortriterpenoides sobre la fagocitosis de partículas de zimosán por los macrófagos murinos. En la figura 26 los datos de los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje del grado de fagocitosis, y cada columna ilustra la media de un experimento de demostración realizado por triplicado, y los asteriscos y las cruces indican $p \leq 0,05$ al comparar, respectivamente, con el grupo que había recibido solamente zimosán (106 part./ml; primera columna) o con el grupo estimulado con zimosán en presencia de IFN- γ (10 UI/ml; tercera columna). Se observa que el tratamiento con tetranortriterpenoides (100 $\mu\text{g/ml}$; segunda columna) inhibió significativamente la fagocitosis basal de los macrófagos peritoneales. El tratamiento de las células con IFN indujo un aumento discreto del grado de fagocitosis y el tratamiento con tetranortriterpenoides fue capaz de hacer disminuir el grado de fagocitosis a valores por debajo del valor basal (cuarta columna; $p < 0,05$).

45 **Ejemplo 22:**

Metodología de ensayos in vivo que se refieren a la inducción de ulceración gástrica aguda por administración oral de tetranortriterpenoides.

Ensayo de inducción de ulceración aguda por tetranortriterpenoides.

50 Este ensayo se efectuó en animales C57/B110 en ayuno durante 24 horas con libre acceso a agua, mantenidos en una jaula que impedía la ingestión de virutas de madera. Los animales recibieron por vía oral, 100 ó 200 mg/Kg de tetranortriterpenoides en el seno de 200 μl de solución salina, con ayuda de una aguja curva especial con extremo esférico. Al grupo testigo se administró solamente solución salina, con el mismo volumen. Cinco horas después de la administración oral los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y fijados en una rejilla con púas adecuadas. El pelo de los animales fue asegurado con alcohol para evitar la interferencia de los pelos mientras se extraía el estómago. El pelo de los ratones fue retirado con unas pinzas planas en la región cercana al órgano genital y se hizo una incisión desde esta región hasta la zona del cuello. Después, se estiró la piel en sentido

horizontal, quedando completamente visible la zona abdominal para poder manipular. A través de una incisión en esta región se aisló el estómago, se extrajo de la cavidad abdominal y se lavó exteriormente con PBS, Cada estómago se abrió por la curvatura más pequeña, se lavó y se hizo pasar a tubos de polipropileno de 50 ml con fondo cónico, debidamente identificados y que contenían PBS. Después de retirar todos los estómagos, fueron colocados cuidadosamente sobre una rejilla y las dos primeras púas se colocaron en las extremidades de la región del fondo y las otras dos, en la región de la cavidad. Con la fijación de todos los estómagos sobre la rejilla, se instilaron 2-3 gotas de PBS en la mucosa gástrica de cada uno de ellos, con objeto de preservar la humedad y se efectuó el análisis macroscópico de la mucosa gástrica por medio de un microscopio estereoscópico. En la tabla que figura a continuación, se describen los parámetros que fueron evaluados, considerando los siguientes grados de la gravedad de las lesiones:

Ligera – cuando la zona afectada es < 25%;

Moderada – cuando la zona es \cong 50%

Intensa – Cuando la zona afectada es > 50%.

Grupo de lesiones gástricas	Gravedad de la lesión	Puntuación	Animal X
1. Color de la mucosa	Normal	1	1
	Hiperémica	2	
	Descolorida	3	
2. Pérdida de pliegues de la mucosa		1	
3. Petequia	Ligera	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	
4. Edema	Ligera	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	
5. Hemorragia	Ligera	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	
6. Pérdida de mucosa	Ligera	1	
	Moderada	2	
	Intensa	3	
7. Lesiones ulcerativas	Hasta 1 mm	1	
	> 1 mm	1,5 x n	
	Perforada	5 x n	
Total			
Media de lesiones			
Desviación típica			
Error típico de la media			

15 **Ejemplo 23:**

Evaluación del daño gástrico in vivo después de la administración oral de tetranortriterpenoides

5 Para evaluar la actividad ulcerógena de los tetranortriterpenoides, se ensayaron dosis de 100 y 200 mg/Kg en ratones C57/B110. Los análisis fueron llevados a cabo 5 horas después de la administración de los tetranortriterpenoides. Los resultados han sido expresados como media del grado de las lesiones, según se ha descrito por Lapa et al. (2003), y el error típico de la media (E.P.M.), y analizados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido del ensayo de comparaciones múltiples de Newman-Keuls, o mediante el ensayo de la T de Student con un nivel de significación menor o igual que 0,05 ($p \leq 0,05$).

10 La Figura 27 ilustra los resultados del tratamiento previo de ratones con tetranortriterpenoides, en dosis de 100 y 200 mg/Kg. Cada barra muestra la media \pm E.P.M. de 7 animales por lo menos. La barra abierta corresponde al grupo de animales que había recibido el vehículo (solución salina). La segunda barra corresponde al grupo que había recibido 100 mg/Kg de tetranortriterpenoides, y la tercera barra muestra los animales que habían recibido una dosis de 200 mg/Kg. La figura 27 pone de manifiesto que la administración oral de tetranortriterpenoides en el ratón no indujo alteración alguna en la mucosa gástrica, conforme a la escala de evaluación descrita en el ejemplo 22, en ninguna de las dosis ensayadas..

REIVINDICACIONES

1.- Una composición farmacéutica caracterizada por comprender como ingredientes activos los componentes (a) o (b) que siguen:

5 (a) 5 a 30% de un aceite extraído de las semillas de *Carapa guianensis* Aublet y 0,01% a 5% de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* Aublet, en la que los tetranortriterpenoides son responsables de la actividad farmacéutica;

(b) 0,01% a 5% de tetranortriterpenoides aislados desde el aceite de *Carapa guianensis* Aublet, en la que los tetranortriterpenoides son responsables de la actividad farmacéutica;

10 en la que la composición (a) o (b) comprende, además, como vehículos y/o aditivos, 0,5 a 6% de bases de emulsión; 0,2 a 2% de vaselina sólida; 0,05 a 0,1% de agentes conservantes; 2 a 20% de agentes humidificantes; 0,1a 10% de 1,8-Cineol; y agua destilada, q.s.p. 100%.

en la que la forma farmacéutica de la composición (a) o (b) es oral o tópica.

2.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por tener forma líquida, sólida o semisólida.

15 3.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la forma farmacéutica es la de una formulación tópica seleccionada entre el grupo que consiste en crema, pomada, loción, gel o suspensión.

4.- Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1a 3, para preparar un medicamento antialérgico, antiinflamatorio, analgésico e inmunomodulador.

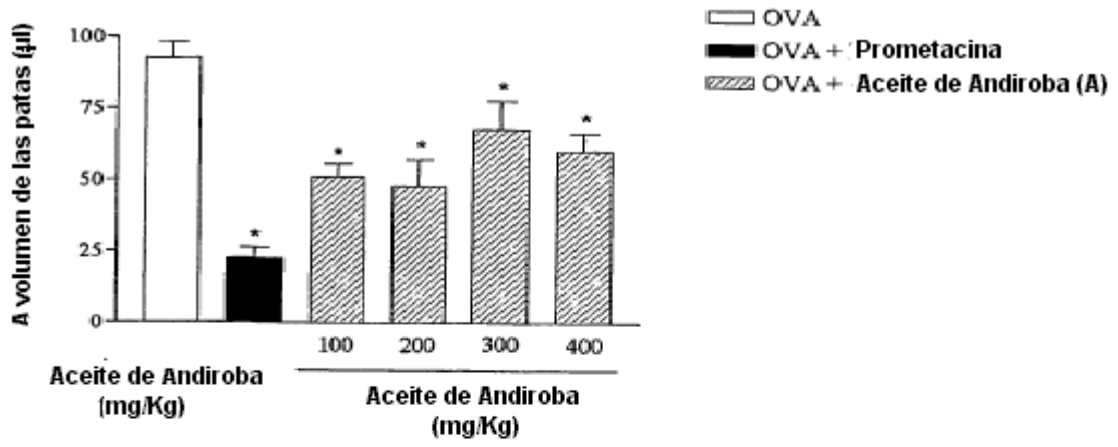


Fig. 1

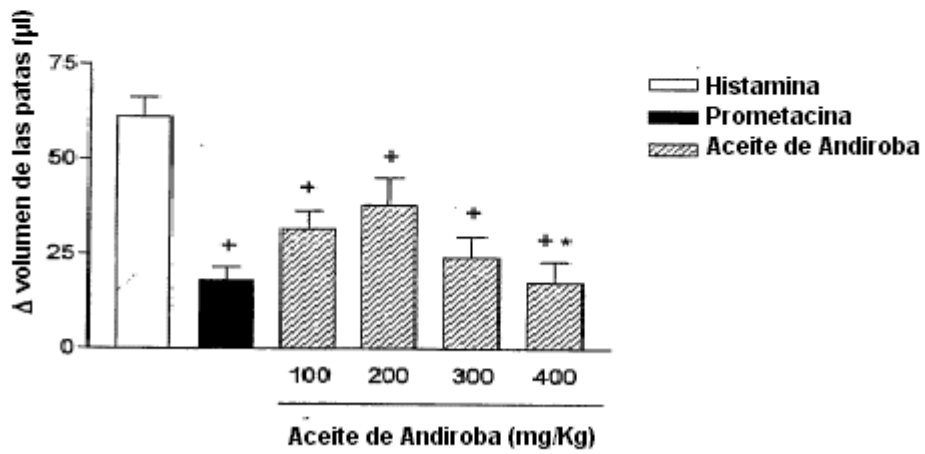


Fig. 2

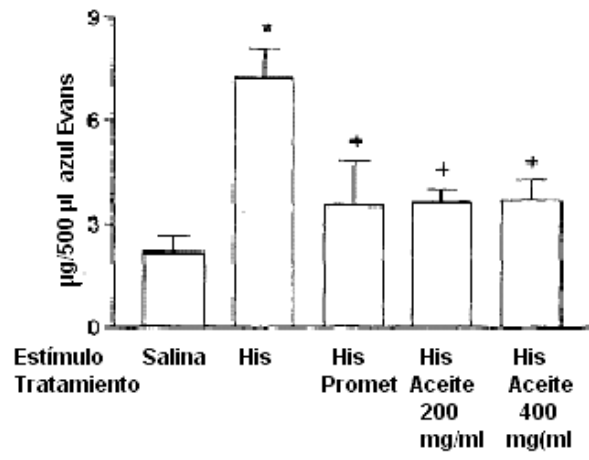


Fig. 3

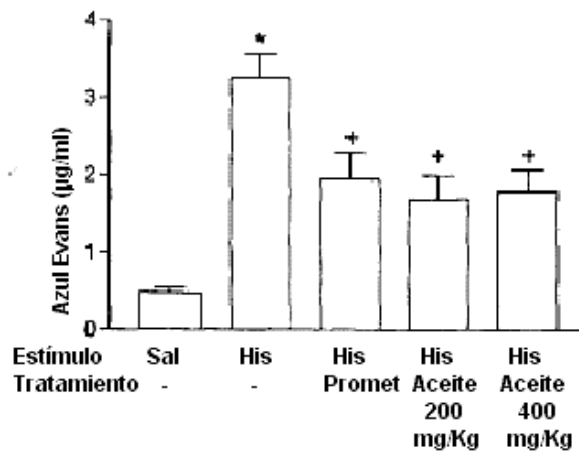


Fig. 4

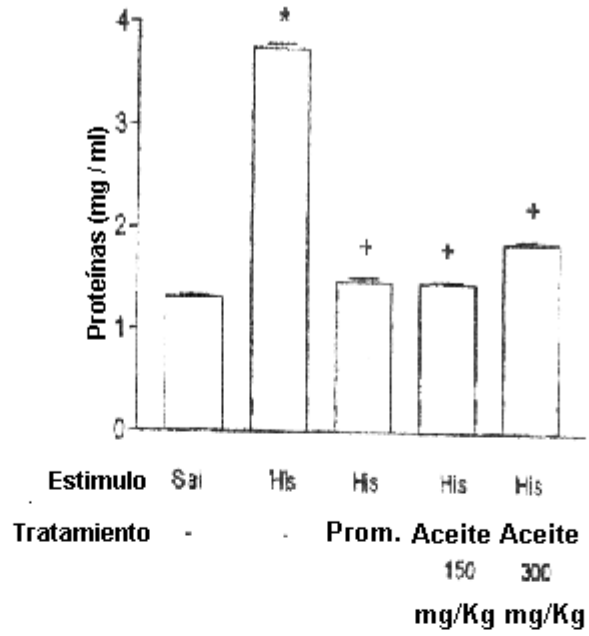


Fig. 5

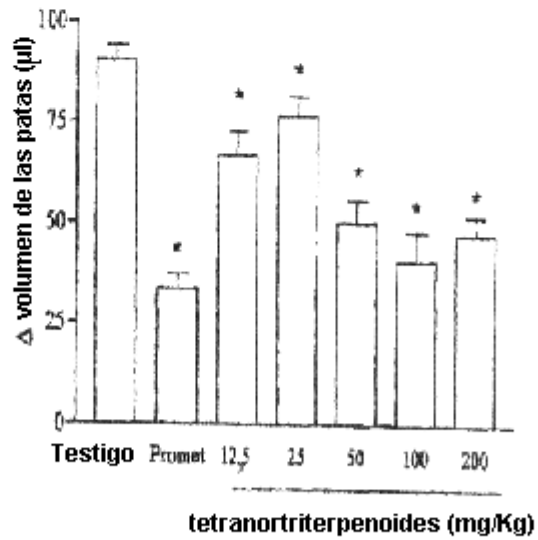


Fig. 6

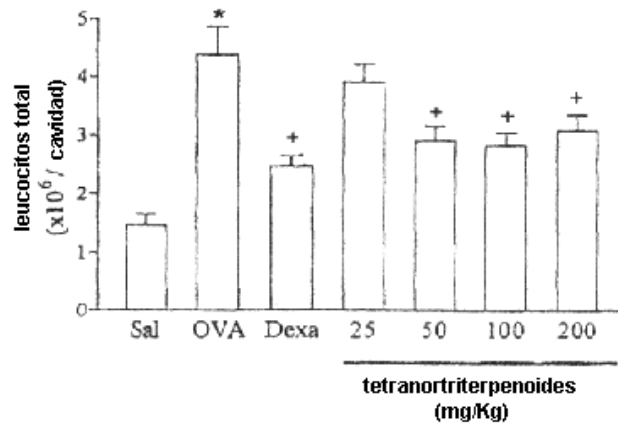


Fig. 7A

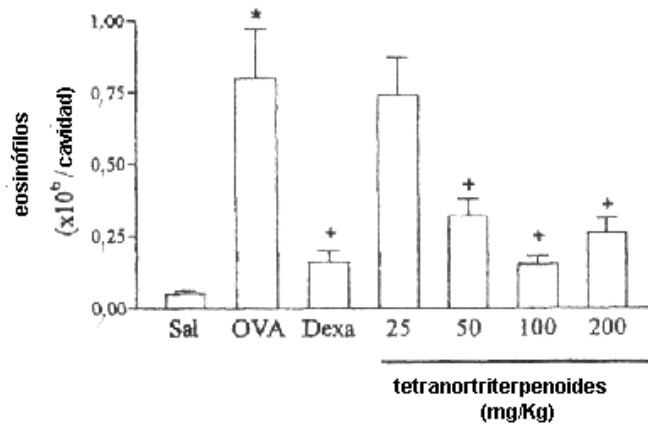


Fig. 7B

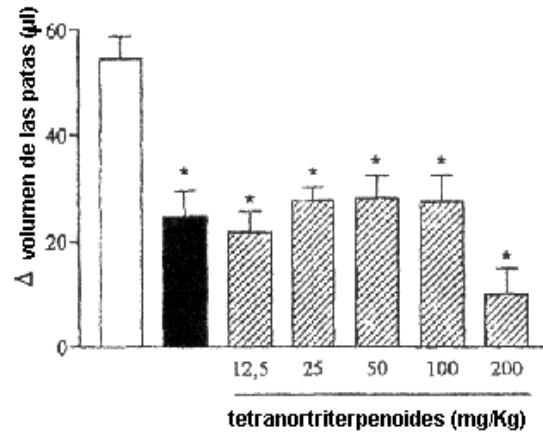


Fig. 8A

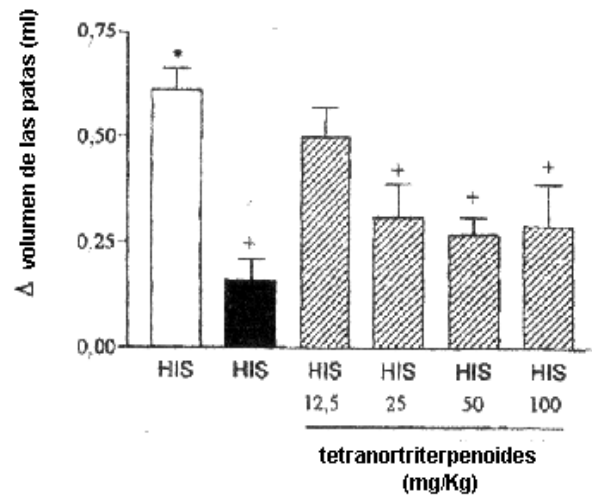


Fig. 8B

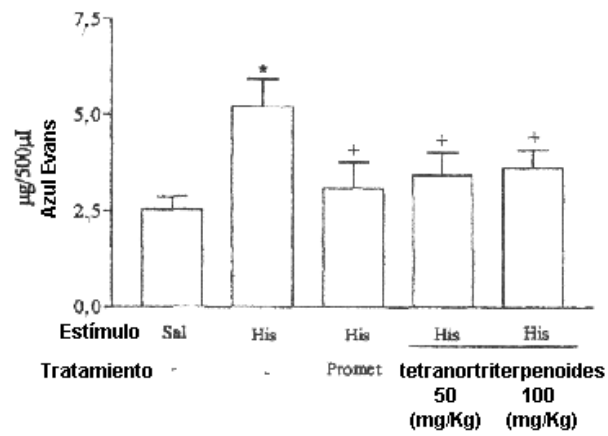


Fig. 9

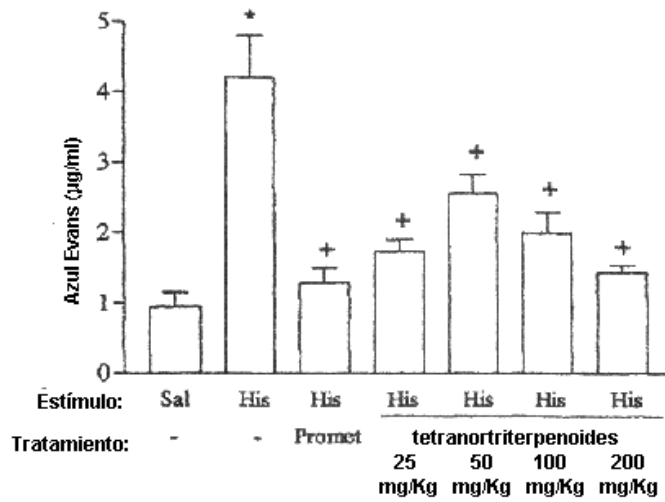


Fig. 10

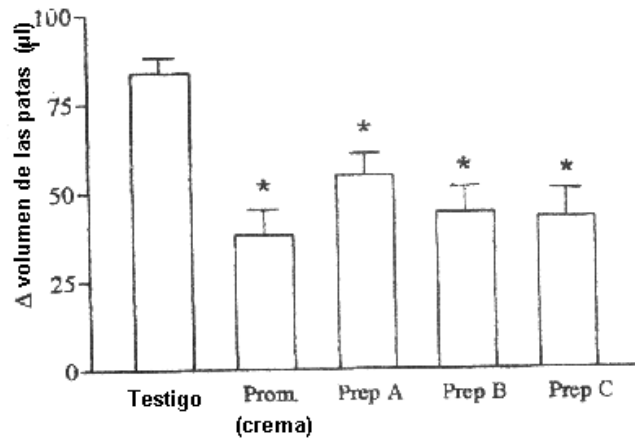


Fig. 11A

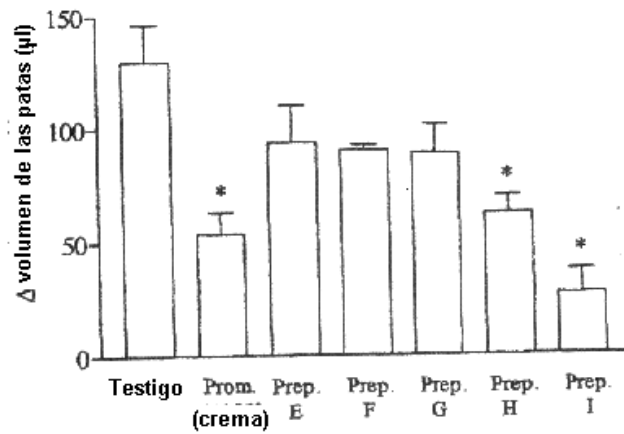


Fig. 11B

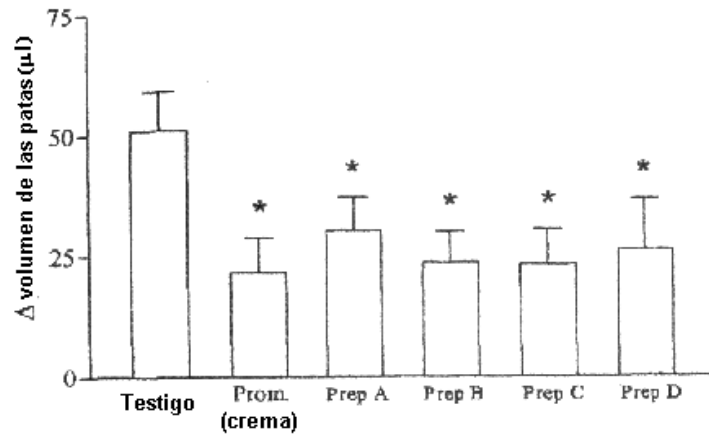


Fig. 12

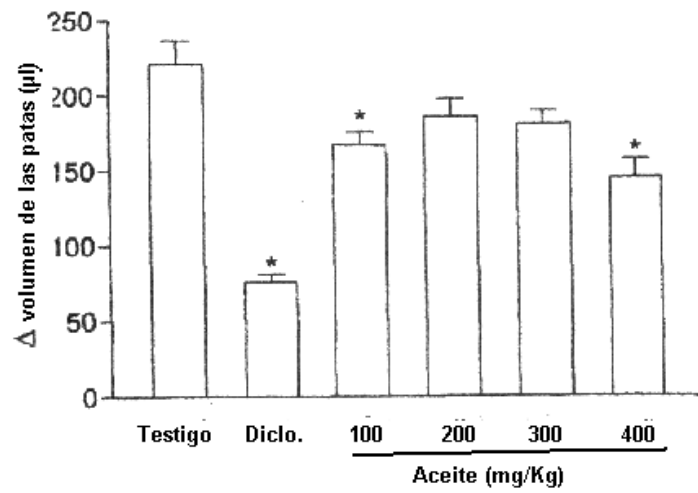


Fig. 13

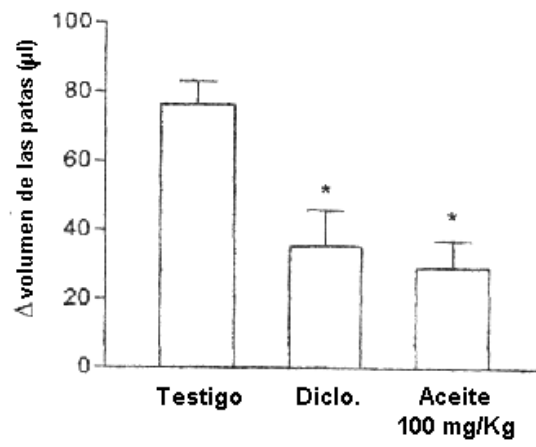


Fig. 14

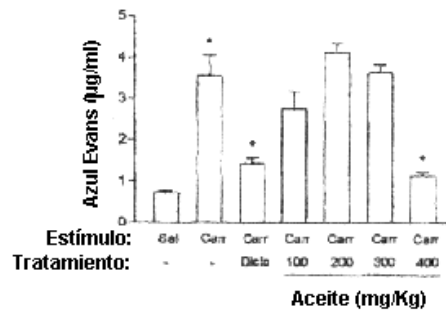


Fig. 15A

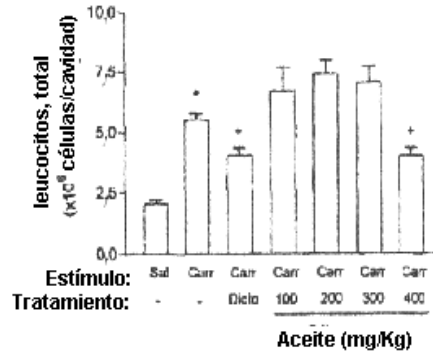


Fig. 15B

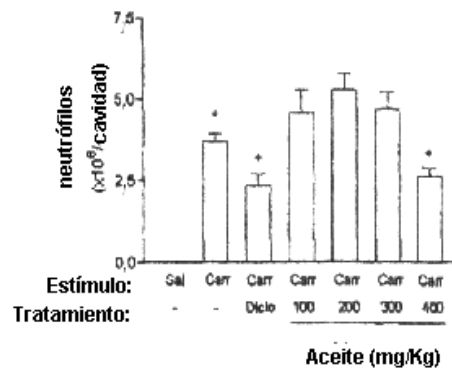


Fig. 15C

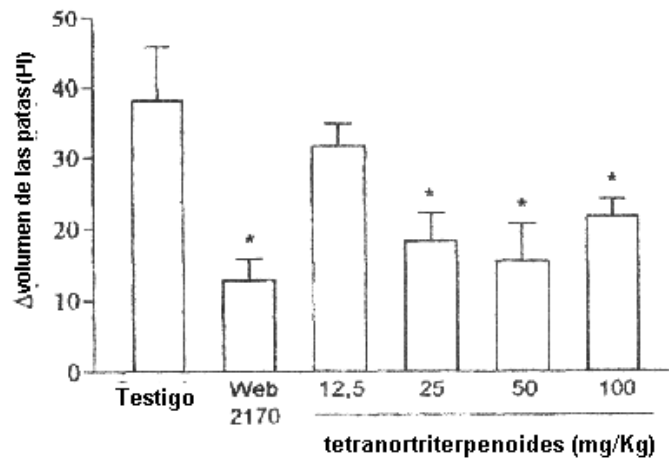


Fig. 16

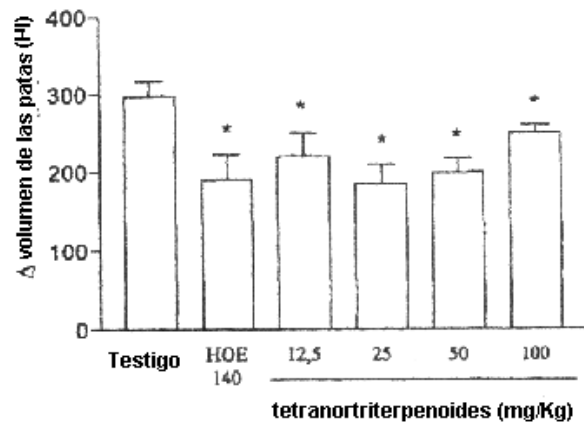


Fig. 17

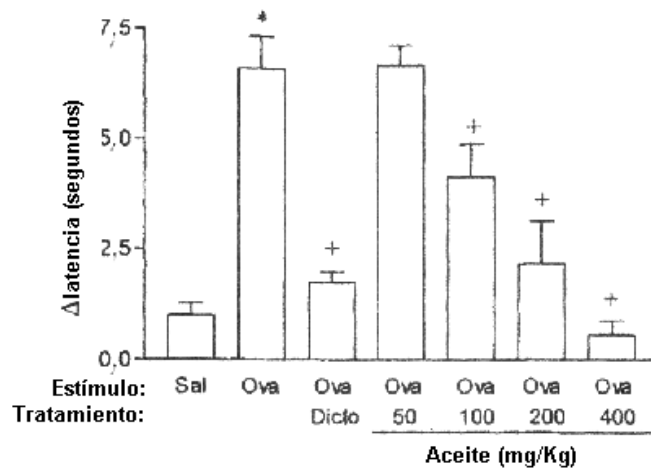


Fig. 18

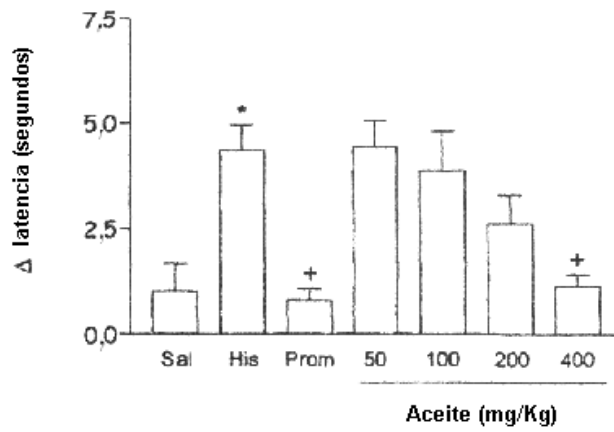


Fig. 19

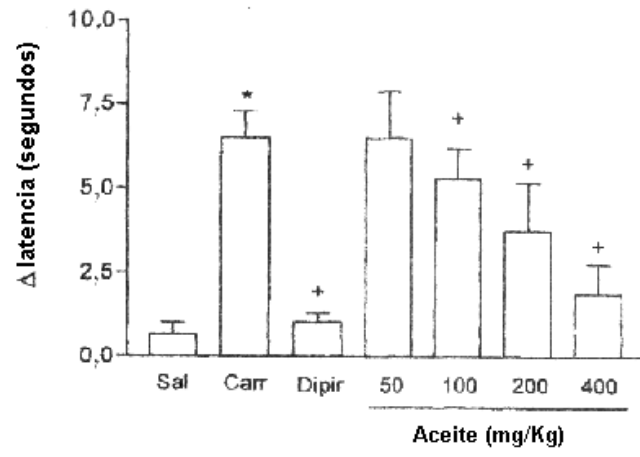


Fig. 20

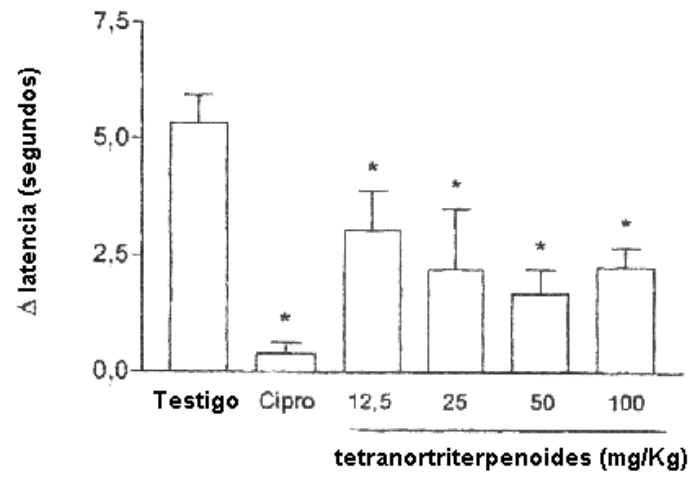


Fig. 21

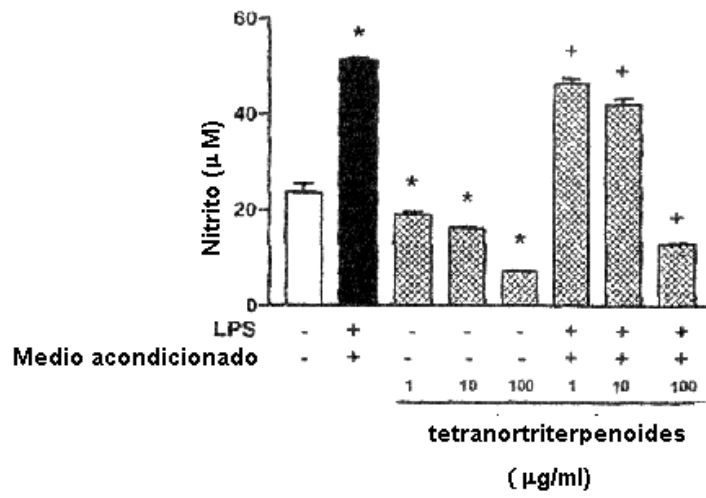


Fig. 22

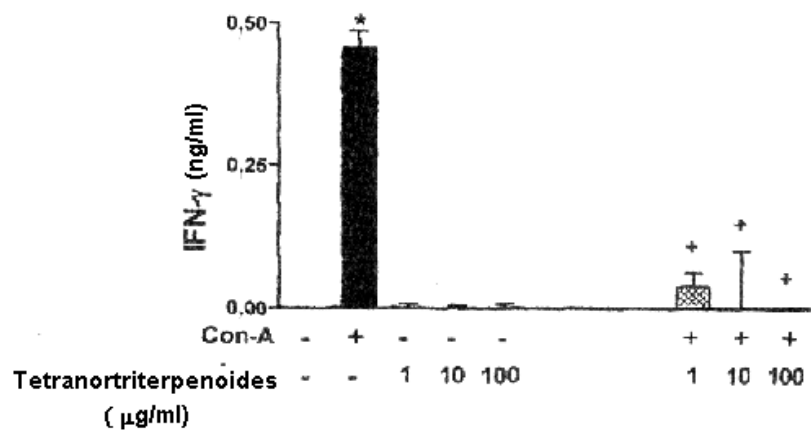


Fig. 23

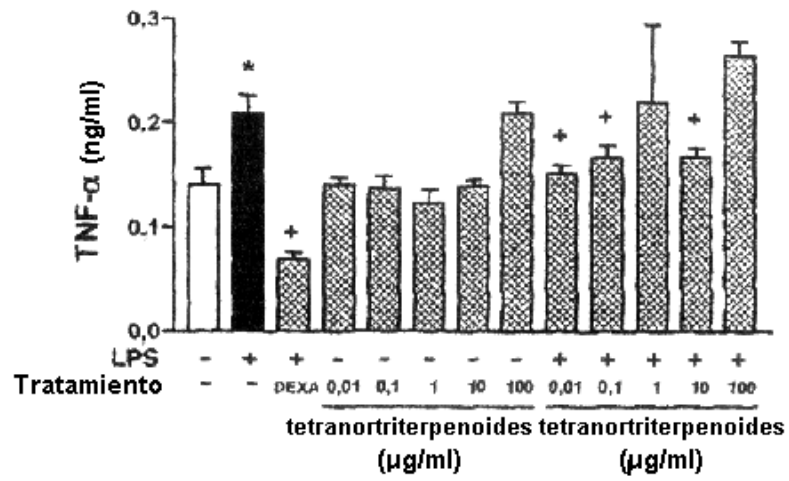


Fig. 24

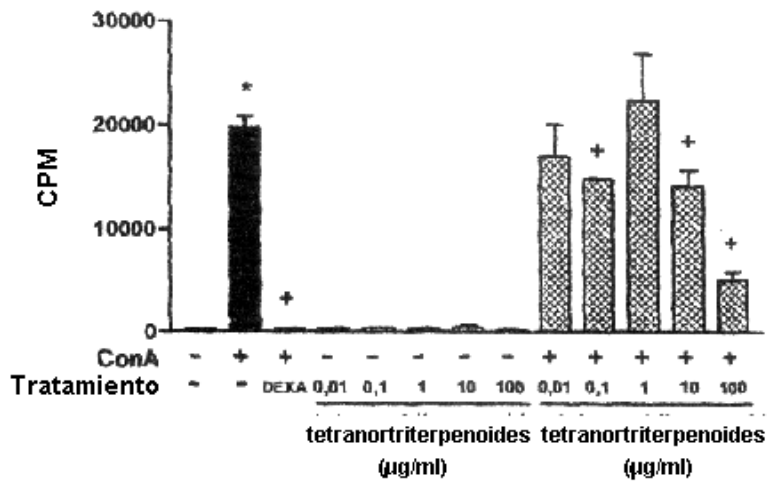


Fig. 25

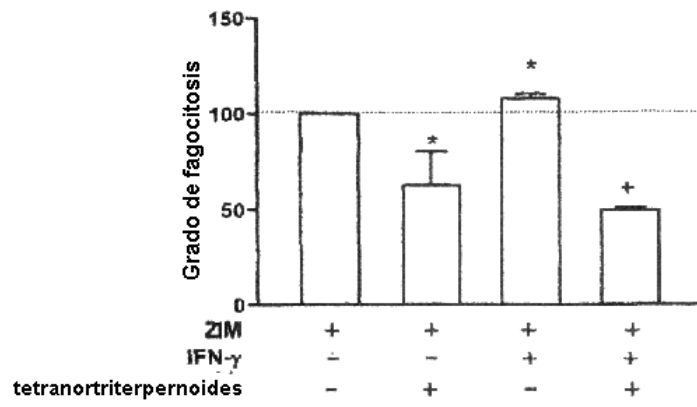


Fig. 26

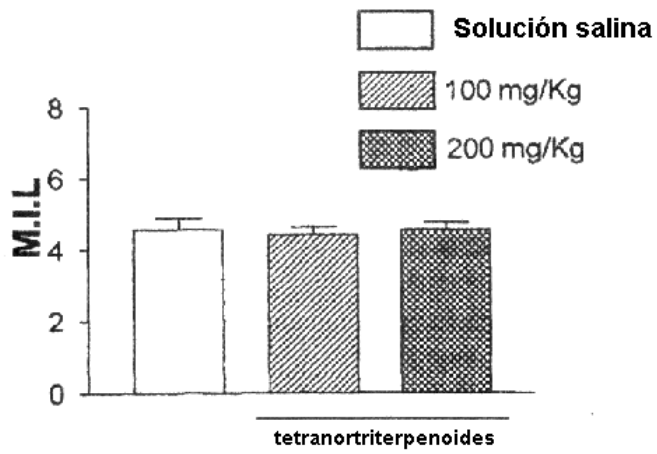


Fig. 27